

Aus der Veterinär-Medizinischen Klinik der
Universität Zürich (Direktor: Prof. Dr. P.F. Suter)
Arbeit unter der Leitung von PD Dr. H. Lutz

Missbräuchliche Anwendung von Thyreostatika bei Schlachtrindern: Nachweis von Methylthiouracil mittels HPLC und HPTLC und Bestimmung von T₄ anhand der FPIA-Methode

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
IMELDA VENZIN
Tierärztin
von Medel GR

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. P.F. Suter, Referent
PD Dr. H. Lutz, Referent
Prof. Dr. F. Untermann, Korreferent

Zürich 1986
Zentralstelle der Studentenschaft

Aus der Veterinär-Medizinischen Klinik der
Universität Zürich (Direktor: Prof. Dr. P.F. Suter)
Arbeit unter der Leitung von PD Dr. H. Lutz

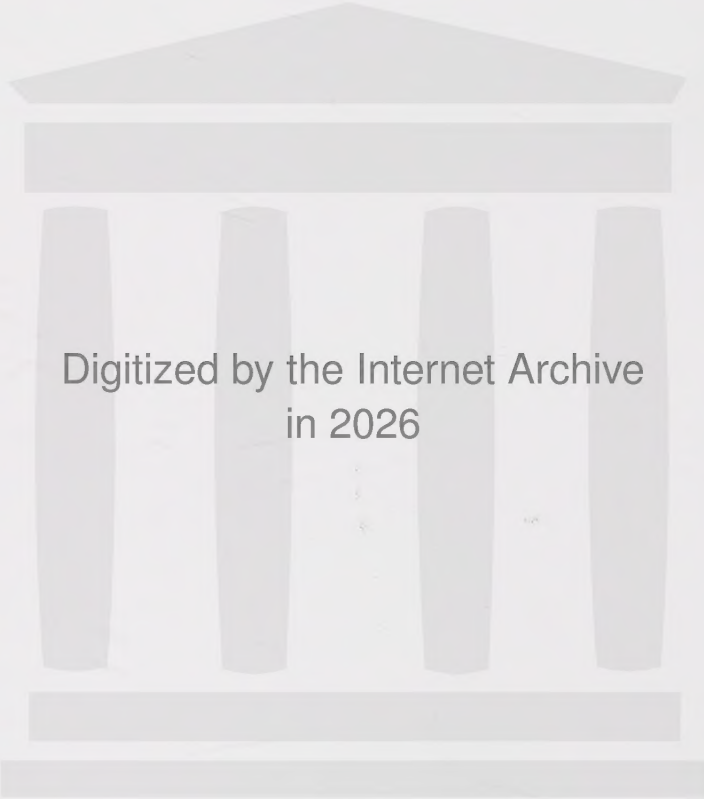
Missbräuchliche Anwendung von Thyreostatika bei Schlachtrindern: Nachweis von Methylthiouracil mittels HPLC und HPTLC und Bestimmung von T₄ anhand der FPIA-Methode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Veterinär-Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
IMELDA VENZIN
Tierärztin
von Medel GR

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. P.F. Suter, Referent
PD Dr. H. Lutz, Referent
Prof. Dr. F. Untermann, Korreferent

Zürich 1986
Zentralstelle der Studentenschaft



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507224_0006

Abkürzungen

DC	Dünnschichtchromatographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFV	Eidg. Fleischschauverordnung
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FPIA	Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie
HVL	Hypophysenvorderlappen
KGW	Körpergewicht
MeOH	Methanol
MTU	Methylthiouracil
MU	Methyluracil
PTA	Phosphotungstic acid (Phosphor-Wolfram-Säure)
RIA	Radioimmunoassay
s	Standardabweichung
T ₃	Triiodthyronin
T ₄	Thyroxin
TSH	Thyreotropes Hormon
VK	Variationskoeffizient
$\bar{x}$	Mittelwert

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG
Problemstellung und Literatur
2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN
 - 2.1 Material und Methoden
 - 2.1.1 Masttiere
 - 2.1.2 Probenentnahme, Probenaufbereitung und -bewahrung
 - 2.1.3 T₄-Bestimmung
 - 2.1.4 Nachweis von MTU
 - 2.2 Ergebnisse
 - 2.2.1 Methodik
 - 2.2.2 Uebersichtsuntersuchung zur Erkennung der missbräuchlichen Anwendung von Thyreostatika
 - 2.2.3 Nachweis von MTU im Serum, Gewebe und Tausaft nach experimenteller MTU-Verfütterung
3. DISKUSSION
 - 3.1 Vergleich der TDx-Methode mit ELISA und RIA
 - 3.2 T₄-Serumspiegel und Transportstress
 - 3.3 T₄-Werte im venösen und arteriellen Blut
 - 3.4 T₄-Serumwerte und Thyreostatikamissbrauch
 - 3.5 Einfluss der Thyreostatikaverfütterung auf das Schilddrüsengewicht
 - 3.6 MTU-Nachweisverfahren
 - 3.7 Dauer des MTU-Nachweises in verschiedenen Organen
4. ZUSAMMENFASSUNG

Abbildungen 1 - 9
Tabellen 1 - 10
5. LITERATURVERZEICHNIS
6. VERDANKUNGEN

1. EINLEITUNG

Problemstellung und Literatur

Die Anwendung von Stoffen mit östrogener oder thyreostatischer Wirkung zur Beeinflussung des Fleisch- oder Fettansatzes bei Masttieren ist in der Schweiz seit 1970 ausdrücklich verboten (Eidg. Fleischschauverordnung, EFG, Art. 29, Abs. 2). Nach Art. 29 der Instruktion für die Fleischschauer ist Fleisch, welches Rückstände von gesundheitsschädlichen oder unzulässigen Stoffen oder solche, welche die festgelegten Grenzwerte überschreiten, zum menschlichen Genuss untauglich.

Thyreostatika sind Stoffe, welche durch Wirkung auf die Schilddrüse den Stoffwechsel beeinflussen. Sie blockieren die Synthese von Thyroxin in der Schilddrüse, wodurch der Grundumsatz sinkt. Gleichzeitig wird dadurch der Rückkopplungsmechanismus zum Hypophysenvorderlappen (HVL) ausgeschaltet. Die Ausschüttung des Thyreotropins durch den HVL wird nicht mehr gehemmt, sondern läuft verstärkt weiter, was zur Hyperplasie der Schilddrüsenepithelien führt.

Anlass zum Einsatz von Thyreostatika in der Rindermast war die durch die Hemmung der Thyroxinsynthese hervorgerufene Grundumsatzsenkung, welche besonders in der Endphase der Mast zu raschen Gewichtszunahmen führen soll (Wöhlbier und Friede, 1966). Da aber thyreostatische Stoffe höchstens eine schwache anabole Wirkung haben, beruht der Masteffekt nur in geringem Mass auf zusätzlicher Bildung von Fett und

Muskulatur. Die erzielten Mehrzunahmen sind vorwiegend auf ein höheres Gewicht des Magen-Darm-Traktes und vermehrte Wasserablagerung im Gewebe zurückzuführen (Frens, 1958; Drepper und Zucker, 1963; Geist, 1963; Terplan et al., 1964; Wöhlbier und Schneider, 1966). Die starke Füllung des Magen-Darm-Kanals beruht nach Frens (1958) auf einer Einwirkung des Thiouracils auf den N. vagus, wodurch die Motilität des Verdauungskanals herabgesetzt und damit die Entleerung von Magen und Darm verzögert sind. Nach Gissel und Schaal (1974) soll die vermehrte Wassereinlagerung dadurch zustande kommen, dass sich infolge der Hypothyreose der osmotische Druck im Gewebe ändert und die Wasserausscheidung über die Niere verzögert wird. Ferner muss die Möglichkeit einer gesundheitlichen Schädigung des Menschen durch Metaboliten von Thyreostatika (Griem, 1973) oder durch langdauernde Zufuhr kleinster Thyreostatikamengen (Matthiesen, 1970) in Betracht gezogen werden. Die Verwendung von Thyreostatika bei der Mast von Tieren ist deshalb abzulehnen.

Zum Nachweis eines Thyreostatikamissbrauches stehen uns direkte und indirekte Methoden zur Verfügung. Die indirekten Methoden zum Nachweis von Thyreostatikaverwendung, wie die Bestimmung der Thyroxin (T_4)-Konzentration im Serum (Seren und Mora, 1973; Pohlschmidt und Forschner, 1979a; Rickenbacher, 1986), des Schilddrüsengewichtes (Vos et al., 1982; Pochard, 1983) und die Schilddrüsenhistologie (Griem, 1973; Pottie, 1979) sind als unsicher zu bewer-

ten. Mit der Thyroxinquantifizierung kann nur eine Unterfunktion des Organs festgestellt werden, über deren Ursache jedoch nichts ausgesagt wird. Eine hyperplastische Reaktion der Schilddrüse, die nach Verabreichung von Thyreostatika beobachtet wird, kann ebenfalls nach Verfütterung bestimmter Futterpflanzen (Rübsamen, Körnermais, Kohlarten, u.a.) oder unter bestimmten Haltungsbedingungen auftreten (Griem, 1973; Pottie, 1979). Ähnlich verhält es sich mit dem Schilddrüsengewicht, das in Zusammenhang mit der Hyperplasie deutlich erhöht sein kann (Vos et al., 1982; Pochard, 1983). Daraus kann gefolgert werden, dass diese drei als Screening-Tests gedachten Untersuchungsmethoden auf einen Thyreostatikamissbrauch hinweisen können. Aber nur in Verbindung mit direktem Nachweis von Thyreostatika können diese indirekten Verfahren den forensischen Anforderungen eines Nachweises von missbräuchlichen Thyreostatikaverwendung genügen.

Zum direkten Nachweis von Thyreostatika werden in der Literatur verschiedene chemische Analysenmethoden beschrieben. Die kolorimetrischen Methoden, deren Reaktion auf Dichlorchinon-Chlorimid (McAllister u. Howells, 1952; Ratliff et al., 1972; Van Waes, 1973) oder auf dem Grote Reagenz beruht (Grote, 1931; Van Genderen et al., 1948; Brüggemann et al., 1952; Sernetz et al., 1966; Böhnel, 1966), scheinen wenig empfindlich und wenig spezifisch zu sein. Die Gaschromatographie, welche von verschiedenen Autoren verwendet wurde, erwies sich als aufwendig (Fravolini u. Begliomini, 1965; Laitem u. Gaspar, 1977).

In den letzten Jahren wurden v.a. Methoden der Dünnschichtchromatographie (DC), bzw. Hochleistungsdünn-schichtchromatographie (HPTLC) und Hochleistungsflüssig-chromatographie (HPLC) zum Nachweis von Thyreostatika ent-wickelt. Für den qualitativen Nachweis hat sich die DC als geeignet erwiesen. Zum Sichtbarmachen der Thiouracile kön-nen ebenfalls das Grote Reagenz oder 2,6-Dichlorchinon-Chlorimid verwendet werden. Durch Ausnützung der Eigen-schaft der Thiouracile, UV-Licht zu absorbieren, kann die Empfindlichkeit dieser Methoden erhöht werden, indem DC-, bzw. HPTLC-Platten mit einem Fluoreszenzindikator verwen-det werden (Gissel und Schaal, 1974; Jarc et al., 1977; Pohlschmidt und Forschner, 1979b; Pochard et al., 1983). Die HPTLC, eine Weiterentwicklung der DC, zeichnet sich ausser durch verbesserte Nachweisgrenze auch durch schär-fere Auftrennungen und schnellere Laufzeit aus (Jarc et al., 1977; Pochard et al., 1983). Die Verwendung einer zweidimensionalen Chromatographie, durch die mit MTU interferierende Substanzen z.T. eliminiert werden können, ist sehr aufwendig, erlaubt aber einen spezifischen Nach-weis (De Brabanter und Verbeke, 1975; Pochard et al., 1983). Für eine Quantifizierung der Thyreostatika eignen sich die Methoden der HPLC (Wildanger, 1975; Comsa et al., 1982; Pochard et al., 1984). Sie sind sehr empfindlich, erfordern aber einen hohen apparativen Aufwand. Grundsätz-lich ist eine quantitative Bestimmung nicht nötig. Es geht allein um Vorhandensein oder Fehlen von Thyreostati-

ka, da keine tolerierbaren Grenzwerte vorliegen. Die HPLC-Analyse bringt jedoch aufgrund der wesentlich tieferen Nachweisgrenze gegenüber der DC und HPTLC in der Rückstandsanalytik einen beachtlichen Vorteil.

Wie aus verschiedenen Publikationen hervorgeht, ist die illegale Verabreichung von Thyreostatika an Mastrinder zur Verbesserung des Masteffektes nach wie vor von Bedeutung (Pohlschmidt und Forschner, 1979b; Postma und Overhans, 1980; Comsa et al., 1982; Vos et al., 1982; Pochard, 1983). Dies erfordert auch in der Schweiz eine Verschärfung der Ueberwachungsmassnahmen und eine Verbesserung der Nachweismethoden bei Schlachttieren (insbesondere auch bei Importtieren).

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen, welche vom Bundesamt für Veterinärwesen unterstützt wurden, war die Untersuchung der folgenden Punkte:

- a) Abklärung der Verwendbarkeit der T_4 -Bestimmung als Screening-Parameter zur Ermittlung eines Thyreostatikamissbrauches unter Feldbedingungen.
- b) Einfluss des Transportstresses und des Schlachtvorgangs auf die T_4 -Werte.

- c) Nachweis von MTU während und nach experimenteller MTU-Verabreichung im Serum, in verschiedenen Geweben und im Tausaft mittels verbesserter HPLC- und HPTLC-Verfahren.

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1 Material und Methoden

2.1.1 Masttiere

2.1.1.1 Schlachtrinder

Um abzuklären, ob die Bestimmung der T_4 -Konzentration unter Praxisbedingungen als Screening-Parameter zum Nachweis missbräuchlicher Anwendung von Thyreostatika verwendet werden kann, wurden in 24 Schlachtbetrieben der Schweiz 328 Masttiere, davon 250 Stiere, 23 Ochsen und 55 Rinder untersucht. Zu diesem Zwecke wurden Blutproben und die Schilddrüsen entnommen.

In diesem Zusammenhang interessierte auch die Frage, inwieweit der Transportstress und der Schlachtvorgang die T_4 -Konzentration beeinflusst. Um dies abzuklären, wurden in einem Vorversuch bei 3 Gruppen von je 9-11 Masttieren Blutproben entnommen, und zwar jeweils auf dem Mastbetrieb vor dem Verladen der Tiere, nach dem Transport in vivo im Schlachthof, am betäubten, hängenden Tier und beim Ausbluten.

2.1.1.2 Versuchstiere

Zwölf Mastkälber*) im Alter von 9-10 Wochen ($\emptyset$ Körpergewicht (KGW) = 99,5 kg) erhielten während 5 Wochen täglich 15 mg Methylthiouracil (MTU)/kg KGW. Das MTU wurde

*) Der Versuch wurde von Herrn F. Cramer, Institut für Veterinärpathologie, ebenfalls im Rahmen einer Dissertation durchgeführt.)

den Tieren mit dem Milchaustauscher verabreicht. Sechs Kontrolltiere wurden unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne MTU gemästet.

Zur Bestimmung der Triiodthyronin (T_3)-, T_4 - sowie MTU-Konzentrationen wurde den Tieren Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte vor der Zufütterung von MTU, dann 8, 14, 21, 29 bzw. 35 Tage nach Zufütterungsbeginn und später jeweils am Tage der Schlachtung.

Das Thyreostatikum wurde bei allen Tieren gleichzeitig abgesetzt. Je drei Kälber wurden am Tag der MTU-Absetzung, dann 3, 7 und 14 Tage nach Absetzen der MTU-Zufütterung geschlachtet, wobei Schilddrüsen, Leber- und Muskelproben für eine MTU-Bestimmung sichergestellt wurden.

In der vorliegenden Arbeit soll nur auf die Methoden zum Nachweis von MTU sowie auf die damit ermittelten Resultate eingegangen werden. Die übrigen Ergebnisse dieses Versuches (T_3 - und T_4 -Bestimmungen, Schilddrüsenhistologie, Gewichtszunahmen, u.a.) werden in der Dissertation Crameri veröffentlicht werden.

2.1.2 Probenentnahme, Probenaufbereitung und -aufbewahrung

2.1.2.1 Blutproben

Alle Blutproben wurden an der Vena jugularis mittels Vaku-
umröhrchen entnommen.

Um den Einfluss des Transportstresses und des Schlachtvorganges auf die T_4 -Konzentration zu untersuchen, wurde EDTA-Blutplasma verwendet. Nach Gewinnung des Plasmas wurden T_4 - und Proteinkonzentrationen ermittelt.

Bei der Uebersichtsuntersuchung wurde von jedem Masttier Blutserum und EDTA-Blutplasma entnommen. Die Blutentnahme erfolgte am betäubten hängenden Tier. In Schlachthöfen, in denen die Tiere nicht aufgehängt wurden, musste das Blut beim Ausbluten entnommen werden. Mittels eines ELISA-Verfahrens wurde noch im Schlachthof die T_4 -Konzentration bestimmt. Dazu wurde das EDTA-Blut jeweils sofort zentrifugiert und das Plasma zur T_4 -Bestimmung verwendet. Die Serumgewinnung erfolgte im Labor. Anschliessend wurde das Serum für eine spätere MTU-Bestimmung eingefroren.

Den MTU-Versuchstieren wurden jeweils zwei Stunden nach der Fütterung Serum- und Plasmaproben entnommen. Im Labor wurde das EDTA-Blut sofort zentrifugiert. Das Plasma wurde für die T_3 -/ T_4 -Bestimmung sowie zur Ermittlung der MTU-Konzentration verwendet.

2.1.2.2 Schilddrüsen, Leber und Muskulatur

Zur Entnahme der Schilddrüse wurde der ganze Kehlkopf zusammen mit dem kranialen Teil der Trachea vom Schlachtkörper entfernt, um eine Durchtrennung der Schilddrüse zu verhindern. Anschliessend wurden die Schilddrüsen freipariert und nach Entfernung des Fettes gewogen. Dann wur-

den sie für die spätere Untersuchung auf Thyreostatika einzeln in Kunststoffsäcke verpackt und bei -28°C gelagert.

Von den Versuchstieren wurden ausser den Schilddrüsen noch Leber- und Muskelproben für eine MTU-Bestimmung sichergestellt. Proben von etwa 50 g wurden in Kunststoffsäcke verpackt und ebenfalls bei -28°C eingefroren.

2.1.3. T₄-Bestimmung

Sämtliche T₄-Bestimmungen wurden zuerst im Plasma mit einem ELISA-Verfahren (ELISA-22, Boehringer Mannheim (Schweiz), 6343 Rotkreuz) durchgeführt. Anschliessend wurden die Proben im Labor noch mittels der Fluoreszenz-Polarisationsmethode (TDx-System, Abbott AG, Diagnostics Division, 6300 Zug) gemessen. Die Proben aus den MTU-Versuchen von Rickenbacher (1986) wurden ebenfalls mittels TDx nochmals gemessen.

Zur T₄-Bestimmung mittels TDx wurden 50 µl EDTA-Plasma mit 50 µl TDx Serum-Denaturierungsreagenz (Abbott, Nr. 9113-30) in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Diese Lösung wurde 5 Sekunden lang auf einem Vortex-Mischer gemischt und konnte anschliessend analysiert werden.

Das TDx-System beruht auf dem Prinzip eines Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay (FPIA). Diese Methode basiert auf der Konkurrenz zwischen dem Thyroxin in der zu messen-

den Probe und einem Thyroxin-Tracer um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen an spezifischen Anti-Thyroxin-Antikörpern. Das System enthält einen mikroprozessorgesteuerten, vollautomatisch arbeitenden Analysator mit einer Fluoreszenz-Polarisations-Messeinheit. Als Tracer wird Fluorescein-markiertes T_4 eingesetzt. Wird der Tracer durch ein linear polarisiertes Licht angeregt, emittiert er Licht, dessen Polarisationswinkel verändert und mittels eines optischen Detektors gemessen wird. Die Veränderungen des Polarisationswinkels spiegeln die Bindung des Tracers an den Antikörper wieder. Die Konzentrationen der gemessenen Probe werden anhand einer im System gespeicherten Kalibrationskurve ermittelt. Dank der hohen Reagentienstabilität braucht das System für eine bestimmte Reagentiencharge nur einmal geeicht zu werden.

2.1.4 Nachweis von MTU

2.1.4.1 Geräte und Reagentien

Es wurden folgende Reagentien verwendet:

- 4 (6)-Methyl-2-thiouracil, purum (Fluka, 69400)
- 6 (4)-Methyluracil, purum (Fluka, 69640)
- Methanol für HPLC (Fluka, 65541)
- Essigsäureäthylester (Fluka, 45763)
- Trichloraethylen (Fluka, 91129)
- Ethanol für HPLC (Fluka, 02855)
- Acetonitril p.a. (Fluka, 00700)
- Chloroform p.a. (Merck, 2445)

- Petroleumbenzin p.a., Siedebereich 40-60°C (Merck, 1775)
- Ammoniak-Lösung 25 % p.a. (Merck, 5432)
- Aquasil (Pierce, 42799)
- Grotes Reagenz (aus "Anfärbereagentien für DC- und Papier-Chromatographie, Merck, 243")
- PTA-Lösung: 10 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ + 8 ml H_3PO_4 (84 %) + H_2O ad 100 ml
- Wasser wurde vollentsalzt und anschliessend in einem Fi-Stream (Fisons, GB) doppelt destilliert
- Zur Trocknung der Extrakte wurde N_2 -Gas, techn. Reinheitsgrad verwendet.

Folgende Geräte wurden sowohl für HPLC wie für HPTLC gebraucht:

- Verschliessbare, silanisierte Zentrifugenröhrchen (10 ml)
- Zentrifugengläser (10 ml)
- Glasröhrchen (8 ml)
- Zentrifuge
- Vortex
- Wasserbad
- Skalpell
- Polytron-Homogenisator (Typ PT 10 OD, Kinematika GmbH, Luzern)
- Polare Sep-Pak-Säulen (Waters, 51900)

Speziell für HPTLC:

Zum Auftragen der Proben auf die mit einem Fluoreszenz-indikator beschichteten HPTLC-Platten (Merck, 5628) dienten graduierte Mikrokapillaren (5 µl). Die Entwicklung der Platten erfolgte in einer vertikalen Trennkammer mit einem Laufmittelgemisch Trichloraethylen: Ethanol (8:2, v/v). Die Auswertung erfolgte durch Bestrahlung der Platte mit einer UV-Lampe bei 254 nm oder durch Besprühung mit dem Grote Reagenz.

Speziell für HPLC:

Für die quantitative MTU-Bestimmung im Serum wurden zusätzlich Eppendorf-Röhrchen und eine Mikrozentrifuge verwendet.

Die HPLC-Analysen wurden mit einem Autosampler SP8780XR (Spectra-Physics) mit einer 20 µl Probeschleife, einer Pumpe 110A (Altex), einer RP-18-Vorsäule (Brownlee 4,6 mm J.D. x 30 mm, 10 µm), einer RP-18-Säule (Kontron, 4,9 mm I.D. x 250 mm, 10 µm), einem UV-Detektor Uvikon 725 (Kontron) und einem Integrator SP 4100 (Spectra-Physics) durchgeführt.

2.1.4.2 Methodik der MTU-Bestimmung

2.1.4.2.1 Nachweis von MTU im Serum mittels HPTLC

Der Nachweis von MTU im Serum mittels HPTLC gliederte sich in folgende Schritte:

- 1) Die Extraktion des MTU's erfolgte mit Essigsäureaethylester; dazu wurden 0,5 ml Serum in ein verschliessbares, silanisiertes Zentrifugenröhrchen mit 2,5 ml Essigsäureaethylester versetzt und 5 mal gekippt.
- 2) Nach Zentrifugation (5 Min., 1000 x g) wurde der Ueberstand mit einer Pasteurpipette abgehebert und bei 70°C im Wasserbad unter Stickstoffstrom bis zur völligen Trocknung eingedampft.
- 3) Der Rückstand wurde in 4 µl Essigsäureaethylester aufgenommen und kurz auf dem Vortex geschüttelt. Von diesen 4 µl wurden mittels einer Mikrokapillare 2 µl entnommen und auf die HPTLC-Platte aufgetragen.
- 4) Die Entwicklung erfolgte in einem Laufmittelgemisch. Trichloraethylen: Ethanol (8:2, v/v). Die Trennung dauerte etwa 15 Min. und wurde in einer geschlossenen Kammer durchgeführt.
- 5) Nach der Trennung wurde die Platte luftgetrocknet und in UV-Licht (254 nm) oder mittels Grote Reagenz ausgewertet.

Die HPTLC-Platte wurde vor der Analyse 1 Std. lang in einem Gemisch von Methanol (MeOH): Ammoniak (9:1, v/v) konditioniert. Vor dem Auftragen der Proben wurde sie mit einem Föhn getrocknet.

2.1.4.2.2 Nachweis von MTU im Serum mittels HPLC

Zum Nachweis von MTU im Serum mittels HPLC stand uns eine quantitative Methode zur Verfügung. Das Prinzip beruhte darauf, dass das Serum enteiwisst wurde (Kim, 1983). Das Verfahren gliederte sich in folgende Schritte:

- 1) 200 µl Serum wurden in ein 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben und mit 600 µl H₂O bidest. verdünnt. Durch Zugabe von 50 µl einer PTA-Lösung wurde das Protein gefällt.
- 2) Die so erhaltene Lösung wurde intensiv auf einem Vortex gemischt und während 60 Min. stehengelassen.
- 3) Nach einem Zentrifugationsschritt (10 Min., 12000 x g) wurde der Ueberstand direkt für die HPLC-Analyse verwendet.

2.1.4.2.3 Bestimmung von MTU in Gewebe und Tausaft mittels HPLC und HPTLC

Die MTU-Bestimmung in den entnommenen Organproben, Leber, Muskulatur und Schilddrüsen wurde im Prinzip nach Angaben von Pochard et al. (1983) in einem modifizierten Verfahren durchgeführt.

Das Prinzip bestand darin, dass das MTU mittels Acetonitril aus dem Gewebe bzw. aus dem Tausaft extrahiert wurde. Nach Eliminierung der Lipide durch Waschen mit Petro-

leumbenzin wurde das Extrakt mittels einer polaren Sep-Pak-Säule gereinigt und anschliessend mittels HPLC bzw. HPTLC analysiert.

Die Probenaufbereitung für die HPLC-Analyse gliederte sich in folgende Schritte:

- 1) Jeweils 1 g der entsprechenden Organe wurde mittels eines Skalpells fein zerkleinert und anschliessend in ein 10 ml Zentrifugenglas verbracht.

Nach Zugabe von 3 ml Acetonitril (gesättigt mit Petroleumbenzin) wurde es während etwa 1 Min. im Polytron (Stufe 1-2) homogenisiert.

Zur Aufbereitung von Tausaft wurden ca. 50 g tiefgefrorene Leber bzw. Muskulatur aufgetaut. 1 g des beim Auftauen freiwerdenden Tausaftes wurde mit 3 ml Acetonitril versetzt und während 1/2 Minute auf einem Vortex gemischt.

- 2) Nach Zentrifugation (5 Min., 1000 x g) wurde die Acetonitrilphase (ca. 2,5 ml) abgehebert und zweimal mit je 2,5 ml Petroleumbenzin (gesättigt mit Acetonitril) gewaschen.

Durch diesen Schritt wurden störende Lipide entfernt, während MTU in der Acetonitrilphase blieb.

- 3) Die Acetonitrilphase wurde bei 70°C im Wasserbad unter Stickstoffstrom bis zur Trocknung eingedampft (Dauer ca. 20 Min.) und der Rückstand in 0,5 ml Chloroform:MeOH (99:1, v/v) aufgenommen.
- 4) Reinigung des Extraktes mittels einer polaren Sep-Pak-Säule: Zunächst wurde die Sep-Pak-Säule mit 5 ml Chloroform:MeOH (99:1, v/v) gespült, dann wurde das Extrakt auf die Säule aufgetragen. Anschliessend wurde die Säule wieder mit 2 ml Chloroform:MeOH (99:1, v/v) gespült; diese erste Fraktion, welche noch kein MTU enthielt, konnte verworfen werden. Zur Elution des MTU's wurde der Eluent gewechselt: mit 3 ml Chloroform:MeOH (85:15, v/v) wurde das in der Sep-Pack-Säule bzw. im Extrakt vorhandene MTU eluiert. Diese 2. Fraktion wurde in einem 5 ml-Glasröhrchen aufgefangen.
- 5) Das aufgefangene Eluat wurde bei 60°C im Wasserbad unter Stickstoffstrom bis zur Trocknung eingedampft (Dauer: ca. 8 Min.) und der Rückstand in 0,5 ml Wasser:MeOH (9:1, v/v) aufgenommen; 20 µl dieser Lösung wurden zur Trennung in die HPLC-Anlage eingespritzt.

Durch Aufnahme des Rückstandes in 100 µl Wasser/MeOH (9:1, v/v), konnte die Nachweisgrenze um einen Faktor 5 verbessert werden.

Für die HPTLC-Analyse sah die Probenaufbereitung folgendermassen aus:

- Bis zum Schritt 4 war die Probenvorbereitung identisch mit jener der oben beschriebenen HPLC-Analyse.
- Der getrocknete Rückstand wurde nicht in einem Gemisch Wasser:MeOH aufgenommen, sondern in 4 µl Essigsäure-aethylester. Nach kurzem Schütteln auf einem Vortex wurden 2 µl davon auf die HPTLC-Platte aufgetragen.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Zur Methodik

2.2.1.1 Beurteilung des TDx-Verfahrens zur Bestimmung von T₄

2.2.1.1.1 Reproduzierbarkeit des TDx

Um die Reproduzierbarkeit des TDx zur Bestimmung von T₄ beurteilen zu können, wurden 2 Serumproben mit einem hohen und einem tiefen T₄-Wert je 10 mal gemessen. Die Resultate sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Mit einem Variationskoeffizienten (VK) von 4,2 % im niedrigen und 2,4 % im hohen Konzentrationsbereich stimmen sie gut mit publizierten Werten (Braun, 1984) und mit den Angaben des Herstellers überein.

Da die Reproduzierbarkeit sehr gut ist, wurden aus Kostengründen in der vorliegenden Arbeit mit wenigen Ausnahmen Einfachbestimmungen durchgeführt.

2.2.1.1.2 Einfluss des Einfrierens der Proben auf die T₄-Konzentration

Um abzuklären, ob längerdauerndes Einfrieren der Proben zu veränderten Resultaten führt, wurden die T₄-Werte von 10 Serumproben einerseits frisch und andererseits nach 3- bzw. 16-wöchiger Lagerung bei -28°C gemessen. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Wie aus Tab. 2 hervorgeht, bleiben die T₄-Konzentrationen während dem Einfrieren konstant. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant (t-Test gepaarter Stichproben: $p > 0,05$).

2.2.1.1.3 Methodenvergleich TDx / RIA / ELISA

Der nachstehende Methodenvergleich hatte zum Ziel, die Uebereinstimmung des TDx-Verfahrens (Abbott, 6300 Zug) mit zwei konventionellen RIA-Methoden (RIA₁: Abbott AG, Diagnostics Division, 6300 Zug; RIA₂: International CIS, Frankreich) und mit der ELISA-Methode (ELISA-22, Boehringer Mannheim (Schweiz) AG, 6343 Rotkreuz) zu untersuchen. Dazu wurden die T₄-Werte in 26 Serumproben, die während 2 1/2 Monaten bei -28°C gelagert worden waren, mittels TDx, RIA's und ELISA bestimmt. Beim untersuchenden Material handelte es sich um Blutproben von Schlachtrindern (vgl. Kap. 2.1.1.1), welche unter verschiedenen Bedingungen gehalten worden waren. Die Resultate dieser Vergleichsuntersuchung sind in Abb. 1 und 2 dargestellt.

Aus Abb. 1 geht hervor, dass TDx und die beiden RIA's mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,936$ (RIA₁) und $0,923$ (RIA₂) gut übereinstimmen. Die ELISA-Resultate ergaben aber weder mit RIA ($r = 0,578$) noch mit dem TDx-Verfahren ($r = 0,700$) eine annehmbare Uebereinstimmung (siehe Abb. 2).

Nach entsprechenden Abklärungen mit der Herstellerfirma des von Rickenbacher (1986) benützten ELISA zeigte sich, dass diese den Test geändert hatte, um eine raschere Analyse der menschlichen Serumproben zu ermöglichen. Diese Änderungen brachten es mit sich, dass sich in 6 % aller Rinderseren Werte ergaben, die nicht mit denen zweier

RIA's übereinstimmen. Als mögliche Ursachen sind Proteine im Rinderserum anzusehen, die mit den für T_4 spezifischen Antikörpern interferieren.

Während Seren von adulten Rindern mit dem ELISA-Test nicht mehr verlässlich gemessen werden konnten, ergab sich bei Kälberserumproben zwischen ELISA und RIA's respektive TDx eine gute Übereinstimmung ($r = 0,956$). Trotzdem darf angenommen werden, dass die von Rickenbacher (1986) erhobenen Werte nach wie vor richtig sind, weil zwischen den mittels ELISA und den mit RIA bestimmten Serumwerten eine gute Korrelation ($r = 0,94$) festgestellt wurde. Ausserdem zeigte sein Fütterungsversuch bei allen fünf Tieren, die MTU erhalten hatten, ein einheitliches Absinken der T_4 -Konzentration auf subnormale Werte, die deutlich unter denjenigen der Kontrolltiere lagen.

2.2.1.2 Methodische Aspekte der MTU-Bestimmung

2.2.1.2.1 Nachweis von MTU und dessen Abbauprodukt MU mittels HPTLC

Bei diesem Verfahren interessierte v.a. die Frage, welche minimalen Mengen an MTU in Serum und Gewebe nachgewiesen werden können und wie diese Nachweisgrenze nach Aufarbeitung einer Serum- bzw. Gewebprobe verändert wird.

Um die absolute Nachweisgrenze von MTU und Methyluracil (MU), ein Abbauprodukt des MTU's, mittels HPTLC zu bestimmen, wurden je 3 Stammlösungen von je 500 mg, 200 mg und

100 mg MTU und MU/1 Essigsäureaethylester hergestellt. Von jeder Stammlösung wurden je 2 µl und 1 µl mittels einer Mikrokapillare auf die HPTLC-Platte aufgetragen. Dies entspricht einer absoluten MTU- bzw. MU-Konzentration von 1, 0,5, 0,4, 0,2 und 0,1 µg pro Analyse.

Bei der Betrachtung der HPTLC-Platten im UV-Licht (254 nm) erscheinen die Thiouracile als dunkelblaue Flecken auf grünem Hintergrund. MTU und dessen Abbauprodukt MU werden einwandfrei aufgetrennt und können aufgrund ihres unterschiedlichen Rf-Wertes identifiziert werden.*) Die Rf-Werte betragen für MU 0,3, für MTU 0,5.

Unter UV-Licht (254 nm) können 0,1 µg MTU bzw. MU noch eindeutig nachgewiesen werden.

Beim Besprühen der Platte mit dem Grote Reagenz, das spezifisch mit der SH-Gruppe der Thiouracile reagiert, heben sich die Flecken als grüne Punkte auf leicht bräunlichem Hintergrund hervor. Eine Menge von 0,2 µg MTU bzw. MU ist in diesem Verfahren noch eindeutig sichtbar, während 0,1 µg kaum mehr erkannt werden können.

*) Der Rf-Wert (Retentionsfaktor) berechnet sich aus dem Quotient der Laufstrecke der Substanz und des Laufmittels im Chromatogramm. (Rf = Laufstrecke der Substanz: Laufstrecke Laufmittel).

Um abzuklären, wieviel MTU nach Aufarbeitung von Serum- und Gewebeproben noch nachgewiesen werden kann, wurde dem Untersuchungsmaterial MTU und MU (gelöst in Wasser) in verschiedenen Konzentrationen zugefügt und anschliessend nach den unter Kap. 2.1.4 beschriebenen Methoden verarbeitet. Im Serum liessen sich noch MTU-, bzw. MU Mengen von 2 µg/ml nachweisen. Die Nachweisgrenze in Gewebe lag bei 0,2 µg MTU, bzw. MU/g.

2.2.1.2.2 Nachweis von MTU mittels HPLC

1) Eichkurve und Nachweisgrenze

Aus einer Stammlösung von 100 mg MTU/l Wasser wurden dem für die HPLC-Trennung verwendeten Eluent (Wasser:MeOH, 9:1) Eichlösungen von verschiedenen Konzentrationen (0,2-5 mg/l) hergestellt und anschliessend gemessen.

Die Eichkurve von MTU ergab im Bereich von 4 ng bis 100 ng eine lineare Abhängigkeit mit einem Korrelationskoeffizient von $r = 0,998$. Die Retentionszeit von MTU betrug 3,3 min.

Die minimale Menge, die noch quantifiziert werden konnte, betrug 4 ng. Die Nachweisgrenze, berechnet als MTU-Signal mit der 3-fachen Extinktion des Grundrauschens der HPLC-Apparatur, betrug 1 ng MTU.

Nach Aufarbeitung einer Probe lag die Nachweisgrenze im Serum bei 0,2 µg MTU/ml, im Gewebe bei 0,02 µg MTU/g. Auf

die Bestimmung von MU (Retentionszeit: 2,8 min.) musste verzichtet werden, weil der MU-Peak in Serum- und Gewebeproben teilweise durch andere Substanzen gestört wurde.

2) Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der unter Kap. 2.1.4. erwähnten Methoden zum Nachweis von MTU im Serum, Gewebe und Tausaft von Versuchskälbern zu beurteilen, wurden 4 Blut-, 3 Leber- und 2 Lebertausaftproben je 5 bzw. 4 mal gemessen. Die Resultate sind in Tab. 3 zusammengestellt.

Mit einem Variationskoeffizienten (VK) zwischen 3,1 und 14 % im Serum kann die Reproduzierbarkeit der Methode I als gut bezeichnet werden. Etwas weniger gut ist die Reproduzierbarkeit in Gewebe- und Lebertausaft (VK: zwischen 7,2 und 18,4 %).

3) Wiederfindungsrate

Um Kenntnisse über die Wiederfindungsrate zu erhalten, wurden zu negativen Seren, negativen Schilddrüsen- und Leberproben MTU-Mengen verschiedener Konzentrationen (0,6-5 µg/ml bzw. g) aus einer Stammlösung von 100 mg MTU/l Wasser zugegeben. Dieses mit MTU aufgestockte Probenmaterial wurde gemäss den Angaben in Kap. 2.1.4 aufgearbeitet. Von jeder Konzentration wurden mehrere Messungen durchgeführt. Die Resultate sind in Tab. 4 zusammengestellt.

Beim Nachweis von MTU im Serum liegt die Wiederfindungsrate bei 77 % im niedrigen (0,6 µg/ml) und bei 115 % im hohen Konzentrationsbereich (5,6 µg/ml). Die Wiederfindungsraten im Gewebe zeigen, dass zwischen 33 und 64 % des MTU's wiedergefunden wird, bei guter Reproduzierbarkeit (VK = 8,4 %).

4) Nachweis von MTU in Gewebe und Tausaft

Die Reinigung des Extraktes von Gewebe und Tausaft (vgl. Abschnitt 2.1.4.2.3., Schritt 4) erfolgte mittels einer polaren Sep-Pak-Säule (Waters, 51900). Das Prinzip der Sep-Pak-Säule bestand darin, das MTU durch geeignete Lösungsmittel von störenden Substanzen (Stoffe mit unterschiedlich polaren Gruppen) zu trennen. Mit dem Lösungsmittel Chloroform: MeOH (99:1, v/v) wurden apolare Stoffe herausgewaschen. Zur Elution des MTU's diente das Lösungsmittel Chloroform: MeOH (85:15, v/v).

In einem Vorversuch wurde abgeklärt, welche Fraktion bei der Reinigung des Extraktes mittels einer polaren Sep-Pak-Säule am meisten MTU enthält. Dazu wurde die Säule zur Elution des MTU's, das in Wasser gelöst hinzugefügt worden war, 12 mal mit 0,5 ml Chloroform: MeOH (85:15, v/v) gespült. Jede dieser 12 Fraktionen wurde einzeln aufgefangen und mittels HPLC analysiert. Daraus ergab sich folgendes:

- In den Fraktionen 2, 3, 4 und 5 war MTU vorhanden, wobei die 3. und 4. Fraktion am meisten enthielten.

- In der 2. und 3. Fraktion wurde nur MTU mit minimalen Verunreinigungen eluiert; nach der 5. Fraktion nahm die Konzentration von unbekannten Substanzen kontinuierlich zu. Gleichzeitig liess sich darin kaum noch MTU nachweisen.

Aus diesen Resultaten wurde geschlossen, dass die ersten 2,5 ml des aus der Sep-Pak-Säule eluierten Materials für die HPLC-Auftrennung ideal seien. In der Folge wurden die Gewebeextrakte mit 3 ml Chloroform : MeOH (85:15, v/v) eluiert, um möglichst alles in einer Probe enthaltene MTU zu erfassen.

2.2.2 Uebersichtsuntersuchung zur Erkennung der missbräuchlichen Anwendung von Thyreostatika

2.2.2.1 T₄-Analysen

2.2.2.1.1 Einfluss von Transportstress und Schlachtvorgang auf die T₄-Konzentration

Die Blutentnahme am betäubten hängenden Tier oder beim Ausbluten wäre ideal; sie ist ungefährlich und der Schlachtablauf wird dabei nicht gestört.

Um abzuklären, welchen Einfluss der Transport und der Schlachtvorgang auf die T₄-Konzentration haben, wurden bei 3 Gruppen von 9-11 Tieren Blutproben vor und nach dem Transport, sowie am betäubten hängenden Tier und beim Ausbluten entnommen. Neben den T₄-Werten wurden jeweils auch die Proteinkonzentrationen bestimmt.

Mit der gleichzeitigen Bestimmung der Proteinkonzentration sollte abgeklärt werden, ob Veränderungen der T_4 -Werte sich durch Änderungen in der Blutzusammensetzung (z.B. Wasserverlust beim Transport, längere Stauung bei der Blutentnahme am betäubten hängenden Tier) erklären lassen.

Aus den Untersuchungen, deren Resultate in Tab. 5 zusammengestellt sind, geht hervor, dass die 3 Gruppen vor dem Transport tiefere T_4 -Werte aufweisen als nach dem Transport. Bei den Gruppen II und III ist die transportbedingte Zunahme der T_4 -Konzentrationen statistisch signifikant (t-Test gepaarter Stichproben: $p < 0,05$). Bei Gruppe I ist die Zunahme nicht signifikant ($p > 0,05$). Durch den Schlachtprozess selbst werden die T_4 -Werte nicht mehr beeinflusst.

Aus Tab. 5 wird ebenfalls ersichtlich, dass die Proteinkonzentration grössere Schwankungen aufweist und diese in keinem Zusammenhang mit den T_4 -Werten stehen.

2.2.2.1.2 Einfluss der Hämolyse auf die T_4 -Werte

Bei der Probenentnahme liess sich gelegentlich feststellen, dass die Proben hämolytisch waren. Hämolyse hatte schon bei Verwendung des ELISA-Verfahrens einen die Hormonbestimmung störenden Einfluss (Rickenbacher, 1986).

Um die Beeinflussung der T_4 -Werte durch Hämolyse im TDx-System zu untersuchen, wurden von 8 Masttieren Doppelpro-

ben entnommen. Die eine Probe wurde mit Druck durch eine dünne Kanüle gepresst und dadurch hämolytisch gemacht. Die andere diente als Kontrolle. In Tab. 6 sind die Resultate dieser 8 Probenpaare zusammengestellt. Es wird deutlich, dass die nachweisbare T_4 -Konzentration in hämolytischem Blut stark erniedrigt ist, und somit hämolytische Proben für die T_4 -Bestimmungen ungeeignet sind. Die in Tabelle 6 aufgeführten Unterschiede sind statistisch signifikant (t-Test gepaarter Stichproben: $p < 0,05$). In der Folge wurden hämolytische Proben mit niedrigen T_4 -Werten in der Auswertung nicht berücksichtigt.

2.2.2.1.3 Unterschiede der T_4 -Konzentrationen in arteriellem und venösem Blut

Zur intravitalen Blutentnahme bei Schlachttieren eignen sich die Schwanzgefäße. Oft wird dabei aber nicht venöses sondern arterielles Blut entnommen. Es stellte sich daher die Frage, ob sich in venösem und arteriellem Blut unterschiedliche T_4 -Werte nachweisen lassen. Um dies abzuklären, wurden von 7 Kühen Blutproben entnommen, und zwar an der Vena jugularis und an der Schwanzarterie.

Aus Tab. 7 wird ersichtlich, dass die T_4 -Konzentration in arteriellem Blut etwas niedriger ist als im venösen. Die Unterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant (t-Test gepaarter Stichproben: $p > 0,05$).

2.2.2.1.4 Bestimmung der T₄-Werte von Schlachtrindern

Die Bestimmung der T₄-Konzentrationen erfolgte in Blutproben, die am betäubten hängenden Tier entnommen wurden. Insgesamt wurden die T₄-Werte bei 328 Masttieren (250 Stiere, 23 Ochsen, 55 Rinder) bestimmt. Die Resultate sind in Abb. 3 zusammengestellt.

Aus den Resultaten können folgende Schlüsse gezogen werden:

- Aus den Histogrammen ist ersichtlich, dass die T₄-Werte beim Stier normal verteilt sind. Eine gültige Aussage bezüglich Normalverteilung beim Ochsen und Rind ist nicht möglich, da zu wenig Proben analysiert wurden.
- Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (s) aller untersuchten Tiere betrugen $118,6 \pm 25,0$ nmol/l. Der höchste resp. tiefste Wert lag bei 191 bzw. 55 nmol/l.
- Die Werte für die einzelnen Gruppen waren:

Stier: $\bar{x} \pm s$: $119,5 \pm 24,8$ nmol/l,

Maximalwert 191 nmol/l

Minimalwert 55 nmol/l

Ochse: $\bar{x} \pm s$: $114,3 \pm 26,9$ nmol/l,

Maximalwert 185 nmol/l

Minimalwert 74 nmol/l

Rind: $\bar{x} \pm s$: $116,3 \pm 25,6$ nmol/l,

Maximalwert 189 nmol/l

Minimalwert 63 nmol/l

Aufgrund der Untersuchungen von Rickenbacher (1986) wurde postuliert, dass bei Tieren mit T_4 -Werten < 80 nmol/l mit Thyreostatikamissbrauch zu rechnen sei, da der tiefste mittels ELISA gemessene T_4 -Wert bei normalen Schlachtrindern bei 87 nmol/l lag. Da die TDx-Methode generell tiefere Werte ergab, wurde es notwendig, diese Schwelle von 80 nmol/l neu zu bestimmen.

Um einen neuen für die TDx-Methode brauchbaren Grenzwert festsetzen zu können, wurden die T_4 -Werte in den eingefrorenen Seren der MTU-Mastochsen aus der Arbeit Rickenbacher (1986) nochmals mittels der TDx-Methode nachgemessen. Im Versuch standen 10 Braunvieh-Mastochsen, wovon 5 während 26 Tagen 5 g MTU/Tag erhalten hatten.

Für die Nachuntersuchung der T_4 -Werte standen uns nur noch die Seren von 4 MTU-Mastochsen zur Verfügung.

In Abb. 4 sind die T_4 -Werte (gemessen mittels TdX) im Verlauf der MTU-Verabreichung bis 7 Tage nach Absetzung des Thyreostatikums dargestellt.

Sieben Tage nach Beginn der MTU-Verabreichung war bei allen 4 Versuchstieren eine gegenüber dem Ausgangswert erhöhte T_4 -Konzentration feststellbar. Danach sanken die T_4 -Werte markant ab und erreichten bis zum 28. Tag (2 Tage nach Absetzung des Thyreostatikums) subnormale Werte (40 nmol/l). Anschliessend stieg der Thyroxinspiegel wieder an

und lag am 33. Tag (7 Tage nach Absetzung des Thyreostatikums) bei allen Tieren über dem Ausgangswert.

Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass die T_4 -Werte 2 Tage nach Absetzung des MTU's (< 40 nmol/l) weit unter dem tiefsten von uns beobachteten Wert bei normalen Schlachtrindern (55 nmol/l) liegen. Falls also das Thyreostatikum nicht früher als 2 Tage vor der Schlachtung abgesetzt wird, sollte eine durch MTU induzierte Schilddrüsenunterfunktion durch Messung der T_4 -Werte mittels TDx ohne Probleme erfasst werden können.

Verglichen mit den T_4 -Kurven aus der Arbeit Rickenbacher (1986) lassen sich also keine prinzipiellen Unterschiede des Kurvenverlaufs feststellen, ausser dass im TDx-Verfahren tiefere Werte ermittelt wurden. Aufgrund unserer Nachuntersuchungen und der von uns bei normalen Schlachtrindern (tiefster beobachteter Wert: 55 nmol/l) erhaltenen T_4 -Werte scheint es gerechtfertigt, den neuen Schwellenwert für den Verdacht auf Thyreostatikamissbrauch auf 60 nmol/l herabzusetzen. Bei Festlegung dieses neuen Schwellenwertes wurde der Einfluss des Transportstresses auf die T_4 -Werte ebenfalls berücksichtigt.

2.2.2.2 Auswertung der Schilddrüsenbefunde

2.2.2.2.1 Schilddrüsenengewichte

Insgesamt wurden 275 Schilddrüsen freipräpariert und nach Entfernung des Fettes gewogen. Die Auswertung der Schilddrüsenengewichte ist in Tab. 8 zusammengestellt.

Bei 3 Stieren wurden Schilddrüsengewichte gefunden, die weit über dem Mittelwert lagen, nämlich 84,8, 81,4 und 80,8 g. Die HPLC-Analyse auf MTU und die histologische Untersuchung ergaben jedoch keinen Hinweis auf Thyreostatikaverfütterung.

2.2.2.2.2 T₄-Werte bei Schlachtrindern in Beziehung zum Gesamtgewicht der Schilddrüse

Wie aus Abb. 5 hervorgeht, besteht zwischen Gesamtgewicht der Schilddrüse und T₄-Werten bei allen 3 Gruppen (201 Stiere, 22 Ochsen, 52 Rinder) keine offensichtlich feststellbare Korrelation.

2.2.2.2.3 Beziehung zwischen Gesamtgewicht der Schilddrüse und Schlachtgewicht

Bei 139 Stieren, 13 Ochsen und 40 Rindern wurde zusätzlich das Schlachtgewicht festgehalten. Wie Abb. 6 zeigt, besteht auch zwischen Schilddrüsengewicht und Schlachtgewicht keine Korrelation.

2.2.2.2.4 HPLC-Analysen

Sämtliche im Rahmen dieser Uebersichtsuntersuchung gesammelten Schilddrüsen wurden nach der in Kap. 2.1.4 beschriebenen Methode mittels HPLC auf Rückstände von MTU untersucht. Dabei konnten in keiner einzigen Drüse Spuren von MTU nachgewiesen werden.

2.2.3 Nachweis von MTU im Serum und Gewebe nach experimenteller MTU-Verfütterung

2.2.3.1 Serum

Die Blutproben, welche den 12 Versuchskälbern in bestimmten Abständen (vor der Zufütterung von MTU, dann 8, 14, 21, 29 bzw. 35 Tage nach Zufütterungsbeginn) entnommen worden waren, wurden unter Verwendung der in Abschnitt 2.1.4 beschriebenen Methoden bezüglich MTU mittels HPLC und HPTLC analysiert. Als positive Kontrolle diente eine Eichlösung von 5 mg MU resp. MTU/l Wasser, als negative Kontrolle die Blutproben der 6 Kontrolltiere, die ohne MTU gemästet worden waren.

2.2.3.1.1 HPLC-Analysen

Während der Mastperiode konnte eine durchschnittliche MTU-Konzentration von $9,9 \pm 1,04$ mg MTU/l Serum gemessen werden, MU (Retentionszeit: 2,8 Min.) war nur in einzelnen Proben und nur in geringen Mengen nachweisbar.

3 Tage nach Absetzung des Thyreostatikums war im Serum kein MTU mehr nachweisbar, dagegen konnten in allen Serumproben geringe Mengen von MU gefunden werden.

In Abb. 7 ist das Chromatogramm einer positiven und einer negativen Serumprobe dargestellt.

2.2.3.1.2 HPTLC-Analysen

Die Auswertung der Platten unter UV-Licht ergab folgende Resultate:

- Während der MTU-Verfütterungsperiode waren alle Seren bezüglich MTU positiv (Rf-Wert: 0,5)

- MU, ein Abbauprodukt von MTU, war nur in einzelnen Proben vorhanden.
- 3 Tage nach Absetzung des Thyreostatikums waren weder MU noch MTU mit unseren Methoden nachweisbar.

2.2.3.2 Gewebe und Tausaft

Jeweils 3 Kälber wurden am Tag der MTU-Absetzung, dann 3, 7 und 14 Tage nach Ende der MTU-Mast geschlachtet. Anlässlich der Schlachtung wurden Schilddrüse, Leber- und Muskelproben entnommen, die anschliessend der MTU-Analytik unterzogen wurden.

Leber- und Muskelproben wurden anfänglich nur bei den Tieren erhoben, die entweder am Tag der MTU-Absetzung oder 3 Tage danach geschlachtet wurden. Es wurde zunächst nicht damit gerechnet, dass nach 7 bzw. 14 Tagen noch MTU-Rückstände nachweisbar sein könnten. Deshalb stand nicht von allen Tieren Leber und Muskulatur zur Verfügung. Nachträglich konnten noch 2 Leber- und 2 Muskelproben sichergestellt werden.

2.2.3.2.1 HPLC-Analysen

Die Resultate der HPLC-Analysen sind in Tab. 9 zusammengestellt. Daraus wird ersichtlich, dass MTU in der Muskulatur in allen Fällen 3 Tage, in der Schilddrüse und in der Leber (nur eine Probe untersucht) noch 14 Tage nach Absetzung des Thyreostatikums nachgewiesen werden kann. Die MTU-Konzentrationen im Tausaft von Leber und Muskulatur liegen in der gleichen Grössenordnung wie im Gewebe.

In einzelnen Gewebeproben war auch MU vorhanden, jedoch in viel geringeren Konzentrationen als das MTU.

Abb. 8 zeigt je ein Chromatogramm einer positiven und einer negativen Schilddrüsen- und Leberprobe. Das Chromatogramm einer Muskelprobe ist mit dem einer Leberprobe vergleichbar und wurde daher nicht abgebildet. Ebenfalls vergleichbar sind die Chromatogramme von Gewebe- und Tausaftproben.

2.2.3.2.2 HPTLC-Analysen

In Tab. 10 sind die Resultate der HPTLC-Analysen zusammengestellt. Es wird ersichtlich, dass MTU in sämtlichen Schilddrüsen von mit MTU gefütterten Kälbern nachweisbar ist, in Leber und Muskulatur noch nach 3 Tagen bzw. am Tag der MTU-Absetzung.

MU war in sämtlichen Schilddrüsenproben nachweisbar mit Ausnahme jener, die 14 Tage nach Absetzung des Thyreostatikums gewonnen wurden. In Leber und Muskulatur dagegen konnte nur in einzelnen Proben MU gefunden werden.

In Abb. 9 ist die Auftrennung von Serum- und Gewebeextrakten mittels HPTLC schematisch dargestellt.

3. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel abzuklären, ob sich in der Schweiz ein missbräuchlicher Thyreostatikaeinsatz nachweisen lasse und welche Methode dazu angewandt werden könne. Dazu wurden in verschiedenen Schlachthöfen der Schweiz Masttieren Serumproben und die Schilddrüsen entnommen. Im Serum wurde die Thyroxin (T_4)-Konzentration bestimmt und die T_4 -Werte wurden mit dem Schilddrüsengewicht in Beziehung gesetzt. Zudem wurden Serum und Gewebeproben mittels HPLC und HPTLC bezüglich MTU untersucht.

3.1 Vergleich der TDx-Methode mit ELISA und RIA

Die Bestimmung der T_4 -Werte wurde zunächst mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA's durchgeführt (siehe Rickenbacher, 1986). Da der Hersteller des ELISA's sein Verfahren in der Zwischenzeit modifiziert hatte, konnte der Test für die T_4 -Bestimmung beim Rind nicht mehr verwendet werden. Auf der Suche nach einem alternativen Verfahren stiessen wir auf die TDx-Methode (Abott AG, Diagnostics Division, 6300 Zug), welche uns zur Lösung der erwähnten Fragestellung geeignet erschien. Die TDx-Methode weist mit einem VK von 4,2 % im niederen und 2,4 % im hohen Konzentrationsbereich eine gute Reproduzierbarkeit beim Rind auf und stimmt gut mit RIA-Verfahren überein. Die guten in der Humanmedizin gemachten Erfahrungen lassen sich somit auch auf das Rind übertragen (Braun, 1984). Nachdem bereits in mehreren Publikationen über experimentelle Untersuchungen zur Eruierung der Richtigkeit und Empfindlichkeit der Be-

stimmung von T_4 im TDx-System berichtet wurde (Braun, 1984; Benes und Heinzel, 1984) wurden diese Aspekte in der vorliegenden Arbeit nicht nochmals aufgegriffen. Besondere Vorteile des TDx sind der hohe mögliche Automatisierungsgrad, die einfache Bedienbarkeit und die schnell verfügbaren Resultate. Obwohl in der vorliegenden Untersuchung die T_4 -Analysen mit TDx in unserem Laboratorium und nicht im Schlachthof durchgeführt wurden, ist hier anzumerken, dass sich das TDx-Gerät problemlos transportieren lässt. Damit eignet sich die TDx-Methode gut zur ambulanten T_4 -Bestimmung im Schlachthof.

Im Gegensatz zum ELISA (Rickenbacher, 1986) hat beim TDx-System das Einfrieren der Proben bei -28°C keinen Einfluss auf die T_4 -Werte. Die Blutproben können am betäubten hängenden Tier oder beim Ausbluten gewonnen werden; der Schlachtvorgang bleibt ohne Einfluss auf die T_4 -Werte. Allerdings muss darauf geachtet werden, dass die Hämolyse der Proben vermieden wird. Die T_4 -Werte in den hämolytischen Proben waren gegenüber den Kontrollen um 42 % erniedrigt. Abnorm tiefe T_4 -Werte von hämolytischen Proben deuten womöglich nur fälschlicherweise auf Thyreostatikamissbrauch hin und dürfen für die Untersuchung nicht verwendet werden. Weisen hämolytische Proben aber normale T_4 -Werte auf, so sind diese als unverdächtig anzusehen.

Ein Nachteil des Einsatzes des TDx-Verfahrens zum vorliegenden Zweck sind die hohen Anschaffungskosten (z.Zt. Fr.

86'000.--) des Gerätes. Auch die Kosten des Testmaterials erscheinen im Vergleich zu einem RIA hoch; trotzdem können Tests vergleichsweise günstig durchgeführt werden, da aufgrund der hohen Reagentienstabilität das System für eine bestimmte Reagentiencharge nur einmal geeicht werden muss. Als vorteilhaft für die T_4 -Bestimmung im Schlachthof erscheint das TDx-System auch daher, da es die Untersuchung einer grossen Probenzahl innert kurzer Zeit ermöglicht (30 Proben pro Stunde). Da es möglich ist, die Resultate innert weniger Stunden zu erhalten, wird der Abtransport der untersuchten Tierkörper nicht verzögert und der Routineablauf im Schlachthof nicht gestört.

3.2 T_4 -Serumspiegel und Transportstress

In einem separaten Experiment wurde abgeklärt, ob die T_4 -Konzentration im Serum von Schlachttieren durch den Transportstress beeinflusst wird. Dazu wurden T_4 -Werte vor und nach dem Transport der Tiere in den Schlachthof gemessen. Nach dem Transport wurde eine durchschnittliche T_4 -Erhöhung von 10,7 nmol/l gefunden, ein Umstand, der auf eine Stimulation der Schilddrüse hindeutet. Stimulation der Thyreoidea durch Stress (= Reaktion des Organismus, charakterisiert durch Ausschüttung von Kortikosteroiden infolge unspezifischer Belastung (Selye, 1953)) wurde bereits früher beobachtet (Kracht und Späthe, 1953; Makumyaviri, 1985). In diesen Arbeiten wurde beschrieben, dass kurz dauernder Stress zu einer Stimulierung, länger dauernder Stress (14 Tage dauernder Transport) zu Hemmung der

Schilddrüsenfunktion führt. Obwohl genaue Angaben über die minimale Stressdauer und Stressintensität, die zu einer Stimulation der Schilddrüse führen können, nicht vorliegen, dürfen wir annehmen, dass bei Schlachtrindern in der Schweiz im Allgemeinen mit ähnlicher Erhöhung der T_4 -Werte zu rechnen ist, wie wir sie in unserem Experiment beobachteten (Transportdauer: $1/2 - 1\ 1/2$ Std.). Dies weil in der Schweiz die Distanzen zwischen Mäster und Schlachthof im Allgemeinen derart kurz sind und damit mit jenen unserer 3 Gruppen verglichen werden können.

Unterschiede der T_4 -Werte vor und nach dem Transport und nach der Betäubung könnten aber auch auf unterschiedliche Proteinkonzentrationen zurückzuführen sein. Wasserverlust durch Schwitzen der Tiere während des Transportes oder längerdauernde Stauung mit erhöhtem hydrostatischem Druck (Blutentnahme beim betäubten hängenden Tier) erhöhen die Proteinkonzentrationen im Serum. Da T_4 im Serum zu mehr als 95 % an Proteine (v.a. thyroxinbindendes Globulin, weniger Präalbumin und Albumin) gebunden ist, wurde die mögliche Beeinflussung des T_4 -Wertes durch die Proteinkonzentration genauer untersucht. Erstaunlicherweise ergab sich keine Abhängigkeit zwischen den beiden Messgrößen. Daraus ist zu schliessen, dass es sich bei der Erhöhung der T_4 -Werte nach dem Transport um einen echten Anstieg der T_4 -Werte handelt, die nicht auf eine Veränderung im Proteingehalt (Wasserverlust) zurückzuführen ist.

3.3 T₄-Werte im venösen und arteriellen Blut

Für die Blutentnahme am lebenden Tier eignen sich die Schwanzgefäße. Dabei wird entweder venöses oder arterielles Blut entnommen. Daher wurde überprüft, ob sich die T₄-Werte in venösem und arteriellem Blut unterscheiden. Die vergleichende Bestimmung von T₄ in venösem und arteriellem Blut desselben Schlachttiers ergab keine signifikanten Unterschiede. Diese Beobachtung vereinfacht die Blutentnahme, indem unabhängig vom punktierten Gefäße jede Blutprobe für die T₄-Bestimmung verwendet werden kann.

3.4 T₄-Serumwerte und Thyreostatikamissbrauch

Da die mittels ELISA bestimmten T₄-Werte - wie sie in der Arbeit von Rickenbacher (1986) gefunden wurden - mit jenen des TDx nicht völlig übereinstimmten, musste ein neuer Schwellenwert für T₄ bestimmt werden, unter welchem beim betreffenden Tier mit Thyreostatikamissbrauch gerechnet werden muss. Zu diesem Zweck wurden die noch vorhandenen Serumproben von 4 Mastochsen aus der Arbeit von Rickenbacher, denen während 28 Tagen MTU verfüttert wurde, mittels TDx bezüglich T₄ untersucht. Es zeigte sich, dass die T₄-Werte bis zu 2 Tage nach dem Absetzen des MTU's unter 40 nmol/l lagen. Ähnliche Beobachtungen machten Pohl-schmidt und Forschner (1979a), welche während 31 Tagen an einem Bullenkollektiv die T₄-Produktion unter MTU-Einfluss (5 g pro Tier und Tag) verfolgten. Auch Seren und Mora (1973) fanden bei 30-tägiger Verfütterung von MTU (6 g pro

Tier und Tag) an Masttieren ein markantes Absinken der T_4 -Werte.

Die im Rahmen der vorliegenden Uebersichtsuntersuchung an unverdächtigen Schlachttieren gefundenen T_4 -Werte im Serum lagen im Durchschnitt bei 118,6 nmol/l, wobei der höchste und der tiefste Wert 191 resp. 55 nmol/l betrugen. Die bei den 4 mit MTU gefütterten Mastochsen gefundenen T_4 -Werte von 40 nmol/l liegen somit wesentlich unter dem tiefsten beobachteten Wert der Uebersichtsuntersuchung. Aus diesen Beobachtungen ergeben sich zwei Schlussfolgerungen:

- 1) Als Schwellenwert für T_4 -Serumspiegel bei Mastrindern, unter welchem man Thyreostatikamissbrauch vermuten muss, kann für das TDx-Verfahren 60 nmol/l festgelegt werden. Dieser Schwellenwert wurde aus den nachstehenden Ueberlegungen bestimmt: Bei den 3 von uns im Zusammenhang mit Transportstress untersuchten Gruppen fanden wir eine durchschnittliche T_4 -Erhöhung (nach dem Transport) von 10,7 nmol/l. Wenn man annimmt, dass eine solche Erhöhung auch bei Tieren zu erwarten ist, denen MTU verfüttert worden war (Abb. 2), dürften die T_4 -Werte solcher Tiere nach dem Transport z.T. im Bereich der tiefsten beobachteten T_4 -Werte von normalen Schlachttieren zu liegen kommen. Allerdings könnte dagegen eingewendet werden, dass die durch MTU gehemmten Schilddrüsen nicht in der Lage seien, im gleichen Mass auf Stress zu reagieren wie unbehandelte Tiere. Zur Beant-

wortung dieser Frage müssten entsprechende Experimente durchgeführt werden. Bei Festlegung des Serum T_4 -Schwellenwertes auf 60 nmol/l müsste man somit mit ca. 0,3 % falsch positive Werte rechnen. Dieser Wert ergibt sich daraus, dass von den 328 untersuchten Schlachttieren ein einziges Tier einen Wert unter 60 nmol/l aufwies, bei welchem aber kein MTU gefunden wurde. Für ein Screening-Verfahren, mit welchem Thyreostatikamissbrauch erfasst werden soll, erscheint ein Prozentsatz von 0,3 % falsch positiver Werte tragbar, da der Aufwand zur nachfolgenden Analyse auf MTU-Rückstände in Leber oder Schilddrüse im Vergleich zum gesamten Screening-Aufwand klein ist.

2. Die in unserer Uebersichtsuntersuchung beobachteten T_4 -Werte deuten darauf hin, dass bei den untersuchten Tieren Thyreostatikamissbrauch nicht vorkommt. Beim einzigen Tier mit einer T_4 -Konzentration unter 60 nmol/l konnte in der gleichzeitigen Analyse der Schilddrüse kein MTU gefunden werden. Das Schilddrüsengewicht jenes Tieres war normal und deutete damit nicht auf Missbrauch eines anderen Thyreostatikums hin. Zwei weitere Tiere aus dem gleichen Betrieb wiesen normale T_4 -Werte auf. Daraus kann geschlossen werden, dass es sich bei diesem Fall nicht um systematische Anwendung von Thyreostatika handelte. Am ehesten lässt sich dieser tiefe T_4 -Wert durch eine nicht erkannte Krankheit erklären (Griem, 1973).

Untersucht wurden Tiere von 6-12 Monaten. Im Verhältnis zur Gesamtzahl der Masttiere dieser Altersgruppe in der Schweiz (männlich: 61'900; weiblich 8'900 (aus: Ergebnisse der Eidg. Viehzählung vom 19. April 1985)) wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nur ein kleiner Prozentsatz (0,5 %) der Masttiere erfasst, so dass sich vereinzelter Thyreostatikamissbrauch nicht ausschliessen lässt.

3.5 Einfluss der Thyreostatikafütterung auf das Schilddrüsengewicht

Wie aus mehreren Publikationen hervorgeht, kommt es bei Verfütterung von MTU und anderen Thyreostatika an Masttieren zu erhöhten Schilddrüsengewichten (Böhnelt, 1966; Griem, 1973; Gissel und Schaal, 1974; Vos et al., 1982; Pochard, 1983; Richenbacher, 1986; Cramer). Die Vergrößerung der Schilddrüsen kann damit erklärt werden, dass die erniedrigten T_4 -Serumkonzentrationen die Abgabe des thyreotropen Hormons (TSH) aus dem Hypophysenvorderlappen erhöhen, was zu einer Hyperplasie der Epithelien und infolgedessen zu einer Gewichtserhöhung der Schilddrüse führen kann.

Um abzuklären, ob sich die Bestimmung des Schilddrüsengewichtes bei Schlachtrindern als Screening-Parameter zur Erkennung von Thyreostatikamissbrauch eignet, wurden die Schilddrüsen von 275 Tieren anlässlich der Schlachtung gewogen. Die von Vos et al. (1982) und Pochard (1983) ange-

gebene obere Grenze von 60 g - über welcher das betroffene Tier als verdächtig für Thyreostatikamissbrauch angesehen werden muss - wurde bei 3 Tieren überschritten. Bei diesen 3 Tieren konnten aber aufgrund der T_4 -Konzentrationen (119, 139 bzw. 142 nmol/l), der histologischen Befunde und der negativen MTU-Nachweise eine missbräuchliche Thyreostatikaverwendung ausgeschlossen werden. Auch die Verabreichung von Futtermittel, welche natürliche antithyreoeide Substanzen enthalten (z.B. Rübsamen, Körnermais, Kohlarten), kann als Ursache dieser erhöhten Schilddrüsengewichte ausgeschlossen werden. In derartigen Fällen hätte man ausnahmslos auch histologische Veränderungen der Schilddrüse im Sinne einer Erhöhung des Follikelepithels zu erwarten (Griem, 1973; Pottie, 1979). Ob die T_4 -Konzentrationen bei Verabreichung solcher Futtermittel unter die beobachteten T_4 -Werte absinken würde, ist zwar zu vermuten. Allerdings sind entsprechende Untersuchungen nicht publiziert worden.

Aus unseren Ergebnissen muss geschlossen werden, dass es sich bei den gefundenen erhöhten Schilddrüsengewichten um normale Extremwerte handelte. Bei einer postulierten kritischen Grenze des Schilddrüsengewichtes von 60 g bei erwachsenen Masttieren müsste somit mit rund 1 % falsch positiver Resultate gerechnet werden. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den Angaben von Vos et al. (1982), welche bei rund 0,8 % falsch positive Schilddrüsengewichte fanden. Im Gegensatz zu unseren Befunden lag bei Pochard

(1983) der prozentuale Anteil falsch positiver Resultate sogar über 30 %. Die Bestimmung des Schilddrüsengewichtes als Screening-Parameter, zur Erkennung von Thyreostatikamissbrauch, wie sie von Pochard (1983) und Vos et al. (1982) vorgeschlagen werden, erscheint der Serum-T₄-Bestimmung unterlegen zu sein. Grund dazu ist der erhöhte Anteil falsch positiver Befunde und der relativ grosse Aufwand der Präparation der Schilddrüse, welche mehr Zeit in Anspruch nimmt als eine T₄-Bestimmung. Allerdings lässt sich über falsch negative Schilddrüsengewichte und T₄-Werte zur Zeit nichts aussagen, da entsprechende an einer grösseren Tierzahl durchgeführte experimentelle Daten nicht vorliegen.

Nachdem die oben erwähnten Autoren gezeigt hatten, dass mit Thyreostatika gefütterte Tiere erhöhte Schilddrüsengewichte aufweisen, stellte sich die Frage, ob Schilddrüsengewichte und T₄-Werte korreliert sind. Falls dies der Fall gewesen wäre, würde die Bestimmung beider Parameter den Verdacht eines Thyreostatikamissbrauchs verstärken. Bereits in der Arbeit Rickenbacher (1986) wurde dieser Fragestellung nachgegangen, wobei jedoch aufgrund der beschränkten Probenzahl keine gesicherte positive Korrelation festgestellt werden konnte. Die von uns an 275 Tieren (201 Stieren, 22 Ochsen, 52 Rindern) erhobenen Vergleichsmessungen (siehe Abb. 5) lassen keine entsprechende Korrelation erkennen.

Ebenfalls keine Korrelation liess sich zwischen Schilddrüsengewicht und Schlachtgewicht der Masttiere feststellen (siehe Abb. 6). Diese Beobachtung bestätigt die an Stieren und Kühen erhobenen Befunde von Pochard (1983). Interessanterweise hatte Pochard (1983) bei Kälbern eine positive Korrelation zwischen Schilddrüsengewicht und Schlachtgewicht festgestellt.

3.6 MTU-Nachweisverfahren

Bei der Erfassung missbräuchlicher Thyreostatika-Verwendung sind erniedrigte T_4 -Konzentrationen nicht ausreichend, um einen gerichtlich nicht anfechtbaren Beweis zu führen. Der Bestimmung der Serum- T_4 -Konzentration kommt jedoch Bedeutung als Screening-Parameter zu. Um forensischen Anforderungen zu genügen, muss der direkte Nachweis der als Thyreostatikum verwendeten Substanz erbracht werden. Da unter den einsetzbaren Thyreostatika das kostengünstige MTU am ehesten verwendet werden dürfte, konzentrierten wir uns auf die Optimierung des MTU-Nachweises.

Der MTU-Nachweis ist im Serum, in verschiedenen Organen, in der Muskulatur und im Tausaft möglich. Die HPLC- und HPTLC-Analysen im Serum wurden im wesentlichen nach Literaturangaben von Pohlschmidt und Forschner (1979b), Kim (1983), Pochard et al. (1984) durchgeführt. Unsere Ergebnisse decken sich weitgehend bezüglich Empfindlichkeit, Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsrate mit denen der oben erwähnten Autoren. Die Probenvorbereitung ist einfach

und benötigt wenig Zeit, so dass eine Person pro Tag bis zu 70 Seren zu analysieren vermag. Ausserdem wird pro Analyse nur 0,5 ml Serum benötigt. Allerdings eignet sich die HPTLC-Methode zum Nachweis von MTU im Serum nur während der eigentlichen MTU-Mastperiode. Mittels der empfindlicheren HPLC-Methode lässt sich MU bis 3 Tage nach Absetzen des MTU's nachweisen. Der Nachweis von MU ist jedoch nicht verlässlich, da MU nicht immer vollständig von Kontaminanten abgetrennt werden kann. Die rasche Elimination von MTU aus dem Serum wurde auch von anderen Autoren beobachtet (Pohlschmidt und Forschner, 1979b; Rickenbacher, 1986).

Der Nachweis von MTU in Gewebe und Tausaft bedingt sowohl für die HPLC als auch für die HPTLC eine etwas aufwendigere Probenvorbereitung als dies bei der Analyse von Serum der Fall ist. Die hier verwendeten Methoden der HPLC und HPTLC wurden nach Literaturangaben (Wildanger, 1975; Pohlschmidt und Forschner, 1979b; Pochard et al., 1983) weiterentwickelt und womöglich vereinfacht. Die Verwendung von Tausaft vereinfacht die Probenvorbereitung und kann angewendet werden, wenn genügend Probenmaterial (50-100 g Leber oder Muskulatur) vorliegt (Pohlschmidt und Forschner, 1979b). Bei der Analyse von MTU mittels HPTLC wurde auf eine zweidimensionale Auftrennung, wie sie von De Brabanter und Verbeke (1975) und Pochard et al. (1983) beschrieben wird, verzichtet, weil dieses Verfahren in Bezug auf Quantifizierung und Empfindlichkeit der HPLC-Methode unterlegen war.

Die HPLC erwies sich als empfindliches und spezifisches Verfahren, erfordert aber einen relativ hohen und teuren apparativen Aufwand. Im Gegensatz dazu ist die HPTLC einfacher und entsprechend kostengünstiger, sie ist jedoch auch weniger empfindlich als die HPLC. Eine routinierte Person kann pro Tag mit HPLC oder HPTLC bis zu 25 Gewebeproben analysieren. Bei der Aufarbeitung von Tausaft fällt der zeitaufwendige Homogenisationsschritt weg, so dass bis zu 40 Analysen pro Tag möglich sind. Bei der Analyse von Gewebe liegt die Nachweisgrenze von MTU für die HPTLC-Methode bei 0,2 µg/g und für die HPLC bei 0,02 µg/g. Die Wiederfindungsrate bei der HPLC-Methode beträgt bei guter Reproduzierbarkeit rund 50 %. Die Ursache dieser erniedrigten Wiederfindungsrate ist nicht bekannt, ist aber in der Bindung von MTU an Zellinhaltsstoffe zu vermuten.

3.7 Dauer des MTU-Nachweises in verschiedenen Organen

Aus den in Tab. 9 und 10 zusammengestellten Resultaten aus dem Kälbermastversuch wird ersichtlich, dass mit der HPLC-Methode MTU-Rückstände noch bis 14 Tage nach Absetzung der MTU-Zufütterung nachgewiesen werden können. Falls der Mäster mit dem MTU-Missbrauch einen wirtschaftlichen Nutzen erzielen will, darf er das Thyreostatikum frühestens 1-2 Tage vor der Schlachtung absetzen (Wöhlbier und Schneider, 1965; Rickenbacher, 1986). Wird diese Ausnüchterungszeit nicht überschritten, kann MTU in Schilddrüse und Leber mittels HPTLC nachgewiesen werden. Steht als Untersuchungsmaterial nur Muskulatur (z.B. Importfleisch)

zur Verfügung, so ist die empfindlichere HPLC zu verwenden. Aber auch hier sollte es in jedem Fall möglich sein, einen MTU-Missbrauch zu erkennen.

In der Literatur finden sich nur wenige Untersuchungen, bei denen der MTU-Gewebespiegel bei Masttieren zu verschiedenen Zeiten nach Beendigung der MTU-Mast ermittelt wurde (van Genderen et al. 1948; Brüggemann et al., 1952; Böhnel, 1966). Nach der längsten beschriebenen Ausnüchterungszeit von 60 h konnte MTU nur noch in der Schilddrüse nachgewiesen werden (Böhnel, 1966). Allerdings wurden hier die Analysen anhand der weit weniger empfindlichen kolorimetrischen Methode durchgeführt.

Die hier gezeigten Experimente zum Nachweis von MTU wurden an Kälbern durchgeführt, denen während 35 Tagen MTU verabreicht worden war (Cramer). Aus Kostengründen wurden diese Experimente nicht an Mastrindern durchgeführt. Es ist aber anzunehmen - wenn auch nicht zu beweisen - dass die Resultate bei Rindern gleich ausgefallen wären wie bei den hier verwendeten Kälbern. Auch wenn bei Mastrindern MTU nur halb so lang nachweisbar sein sollte wie bei den von uns untersuchten Kälbern, wäre damit der Nachweis eines den Bauern nutzbringenden Thyreostatikamissbrauches ohne weiteres möglich.

Bei den von uns untersuchten 328 erwachsenen Masttieren liess sich mittels HPLC in den Schilddrüsen kein MTU nach-

weisen. Diese Befunde decken sich auch mit den beobachteten T_4 -Werten.

Erhöhte Gewichtszunahmen, bessere Futterverwertung und erhöhte Schilddrüsengewichte können aber ausser mit Thyreostatika noch mit anderen Substanzen erreicht werden, die allerdings wie Thyreostatika z.T. nicht erlaubt sind (EFV, 1957). Als solche Substanzen werden in der Literatur Stoffe mit östrogener (Heizmann et al., 1980; Donaldson, 1977) und androgener (Burris et al., 1958; Heizman et al., 1980) Wirkung angegeben. Von den Androgenen wie von den Oestrogenen (nur in niedriger Dosierung) ist bekannt, dass sie eine echte anabole Wirkung besitzen (Karg, 1966; Blum, 1983) und dass die besten Ergebnisse durch Kombination beider Präparate erzielt werden können (Heizmann, 1978; Heizmann et al., 1980). Auf den Einfluss dieser Stoffe auf die Schilddrüsenfunktion wird jedoch nur in wenigen Publikationen eingegangen. Burris et al. (1958) beobachteten nach Testosteron-Applikation bei Stieren und Rindern erhöhte Gewichtszunahmen und vergrösserte Schilddrüsen; die Gewebekonzentration von T_3 und T_4 in der Schilddrüse war erniedrigt, was auf eine Depression des Organs schliessen lässt. Heizmann et al. (1980) stellten fest, dass nach Androgen- bzw. Androgen- und Oestrogen-Implantaten bei Stieren und Rindern die T_4 -Konzentration im Plasma gegenüber den Kontrollen signifikant erniedrigt war (< 40 nmol/l). Von den Oestrogenen weiss man aus Versuchen an Schafen, dass sie die T_4 -Konzentration im Plasma erniedri-

gen (Donaldson, 1977). Man nimmt an, dass Oestrogene und Androgene bei Schafen und Rindern die gleichen Effekte hervorrufen und dass sich die Versuchsergebnisse vom Schaf auf das Rind übertragen lassen (Heizmann et al., 1980).

Werden also bei einem gesunden Masttier niedrigere Serum-T₄-Werte und erhöhte Schilddrüsen Gewichte beobachtet, muss daran gedacht werden, dass ein Missbrauch der genannten Substanzen vorliegen könnte, v.a. wenn eine chemische Untersuchung auf Thyreostatika negativ ausfällt. In einem solchen Fall erscheint es gerechtfertigt, dass im betreffenden Betrieb unangemeldete Entnahmen von Futterproben durchgeführt werden und dass ein solcher Betrieb bezüglich möglicher Ursachen der beobachteten Schilddrüsendepression genauer untersucht wird.

Obwohl die Resultate der vorliegenden Untersuchungen keine Anhaltspunkte für eine missbräuchliche Anwendung von MTU oder anderer thyreostatisch wirksamer Substanzen ergaben, wird damit die Möglichkeit eines gelegentlichen MTU-Einsatzes nicht völlig ausgeschlossen. MTU ist im Handel leicht erhältlich. Dies lässt sich daraus schliessen, dass von einer die Tierärzte beliefernden schweizerischen Arzneimittelfirma MTU in 100 g Mengen ohne Schwierigkeiten durch einen Tierarzt zu beschaffen war.

Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die massgebenden Behörden wachsam sein müssen und zuverlässige Untersuchungsmethoden zur Verfügung haben müssen, die sich rasch einsetzen lassen, um Missbräuche zu unterbinden.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Der Nachweis illegaler Thyreostatikaaanwendung kann durch direkte und indirekte Verfahren geführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zum direkten Nachweis von Methylthiouracil (MTU) im Serum, Gewebe und Tausaft erarbeitet. Im Rahmen einer Uebersichtsuntersuchung an 328 Schlachttieren wurde abgeklärt, ob mit Thyroxin (T_4)- und Schilddrüsengewichtsbestimmungen sowie durch direkten MTU-Nachweis MTU-behandelte Tiere erfasst werden können.

Bei 12 Mastkälbern, welche MTU während 35 Tagen in einer Dosierung von 15 mg/kg Körpergewicht (KGW) und Tag erhielten, wurden das Serum und nach der Schlachtung (jeweils 3 Tiere wurden an verschiedenen Tagen nach Ende der MTU-Mast geschlachtet) Schilddrüsen, Leber und Muskulatur mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) und Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) analysiert.

Im Serum konnte das MTU während der ganzen MTU-Verfütterungsperiode mit beiden Methoden nachgewiesen werden. Drei Tage nach Absetzung des Thyreostatikums war nur noch Methyluracil (MU), ein Abbauprodukt des MTU's nachweisbar. Die Nachweisgrenze nach Extraktion einer Serumprobe lag bei 2 μg MTU/ml für die HPTLC bzw. bei 0,2 μg MTU/ml für die HPLC.

In der Schilddrüse und Leber war das MTU mittels HPLC 14 Tage, in der Muskulatur noch 3 Tage nach Absetzung des

Thyreostatikums nachweisbar. Mittels HPTLC konnte das MTU in den Schilddrüsen bis 14 Tage, in der Leber bis 3 Tage nach Ende der MTU-Mast und in der Muskulatur nur am Tag der MTU-Absetzung nachgewiesen werden. Nach Probenaufbereitung betrug die Nachweisgrenze 0,02 µg MTU/g (HPLC) bzw. 0,2 µg MTU/g (HPTLC).

Die Bestimmung der T₄-Konzentration bei der Uebersichtsuntersuchung erfolgte mit dem neuen TDx-Verfahren, welches sich als schnelle und präzise Methode erwies. Der tiefste beobachtete Wert lag bei 55 nmol/l und war deutlich abgesetzt von den bei MTU-Tieren ermittelten Werten (< 40 nmol/l).

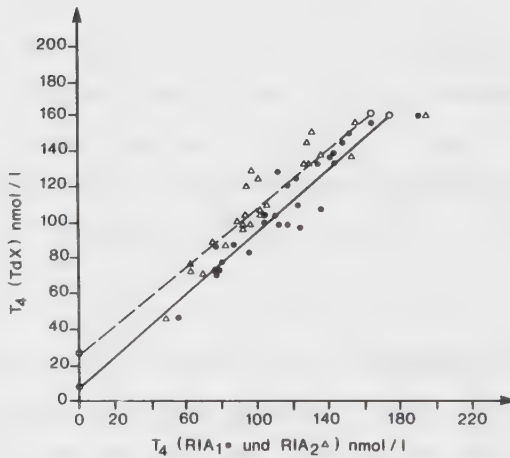
Von den 275 gewogenen Schilddrüsen wiesen 3 ein Gewicht von über 80 g auf. Die histologische Untersuchung ergab jedoch keinen Hinweis auf Thyreostatikaverfütterung. Die HPLC-Analyse, mittels der alle gesammelten Schilddrüsen auf MTU-Rückstände untersucht wurden, fiel ebenfalls negativ aus.

Aus allen diesen Untersuchungen kann geschlossen werden, dass Thyreostatika in der Schweiz - wenn überhaupt - nicht im grösseren Rahmen zur Anwendung kommen.

Abb. 1

Vergleich der Resultate des T_4 TDx mit jenen zweier RIA's

Abb. 1



Von 26 Schlachttieren wurden Serumproben, welche während 2 1/2 Monaten bei -28°C gelagert worden waren, mittels TDx und zweier RIA's bezüglich T_4 analysiert. Ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,936$ (RIA₁) und $0,923$ (RIA₂) deutet auf eine gute Uebereinstimmung der beiden Methoden hin. Die Regressionsgeraden sind charakterisiert durch: $y = 0,86x + 8,36$ (RIA₁: ausgezogene Linie) und $y = 0,8x + 26,4$ (RIA₂: gestrichelte Linie).

Abb. 2

Vergleich der Resultate des T_4 ELISA mit jenen des RIA und
TDx

Abb. 2

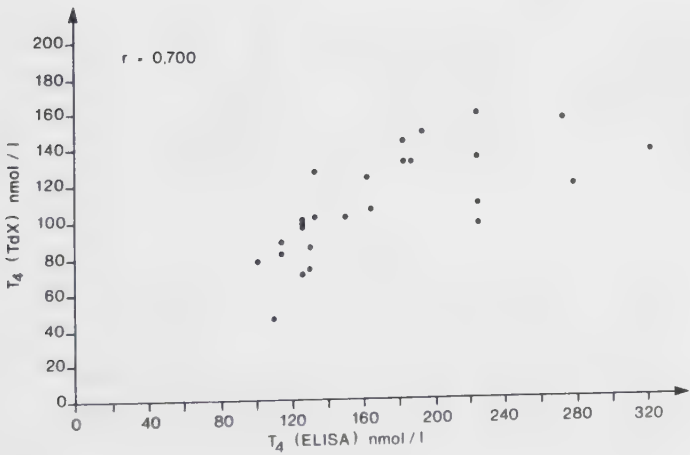
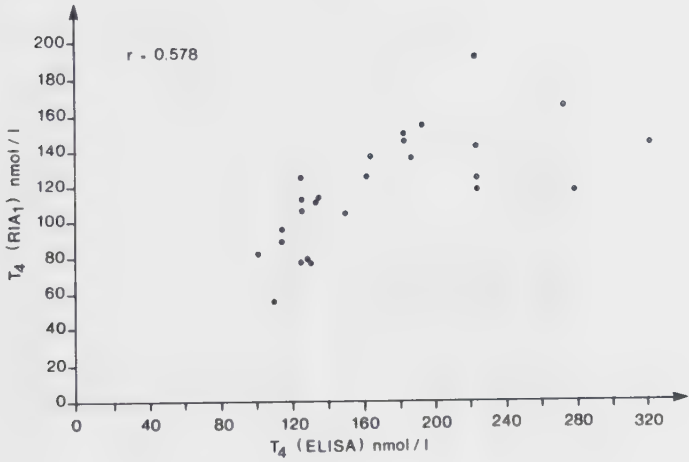


Abb. 3

Histogramme, statistische Masszahlen und einfache Varianz-
analyse von T_4 bei Stier, Ochs und Rind

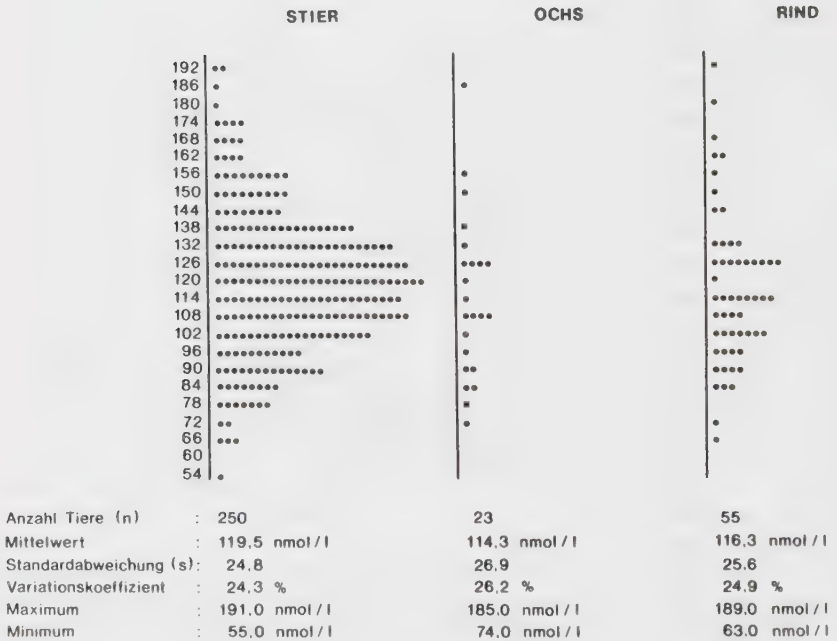
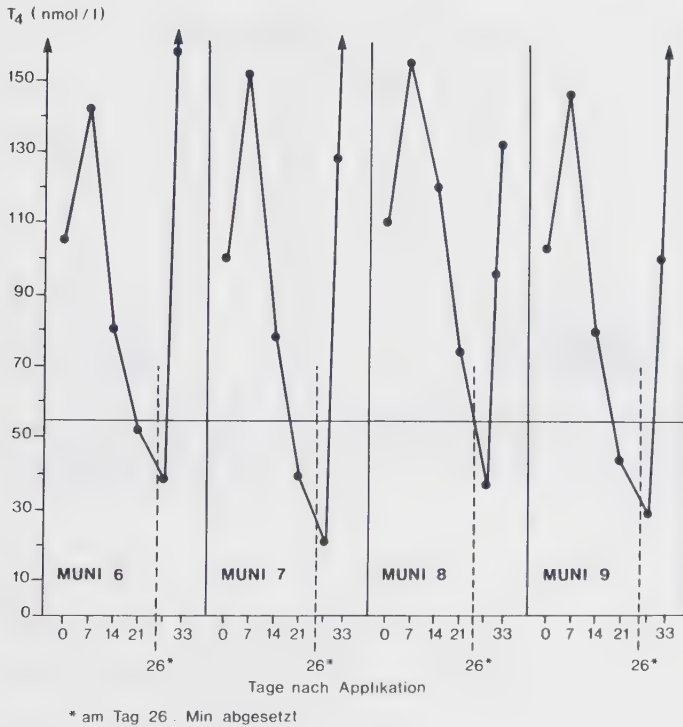


Abb. 4

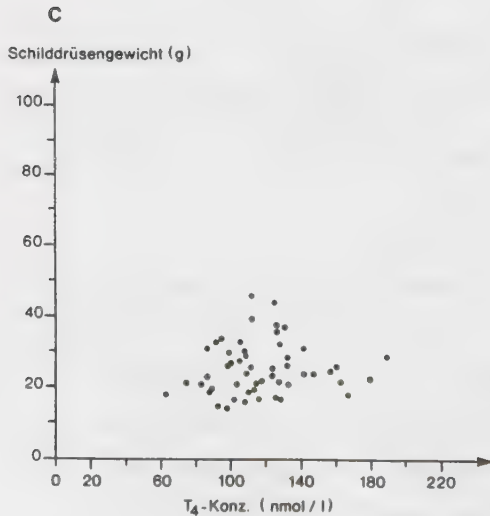
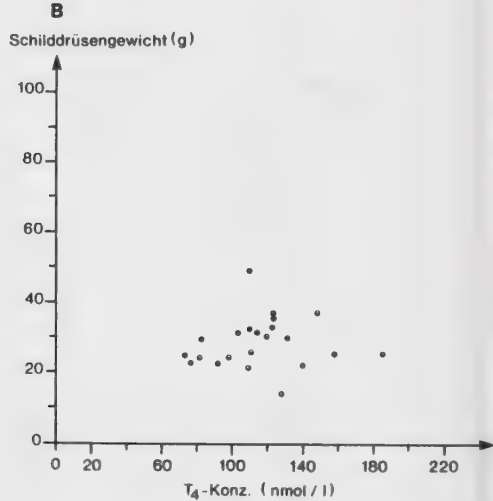
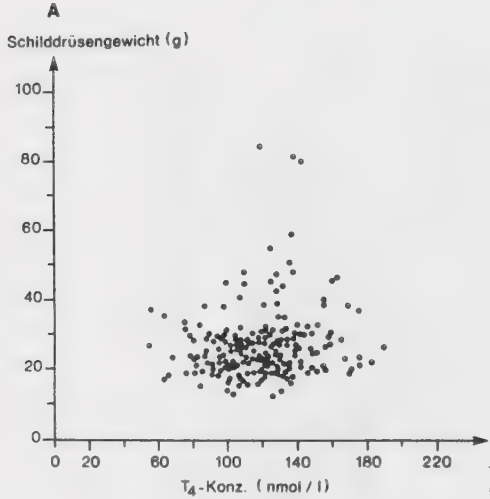
T₄-Werte im Verlauf der MTU-Verabreichung bis 7 Tage nach
Absetzung des Thyreostatikums



Aus dem Verlauf der Kurven wird deutlich, dass 2 Tage nach Absetzen des MTU's bei allen 4 Versuchstieren die T₄-Werte unter 40 nmol/l abgesunken sind. Der tiefste beobachtete T₄-Wert bei normalen Schlachttieren betrug 55 nmol/l und ist in dieser Abbildung eingezeichnet. Damit befinden sich die T₄-Werte der 4 Versuchstiere wesentlich unter den normalerweise zu findenden T₄-Konzentrationen.

Abb. 5

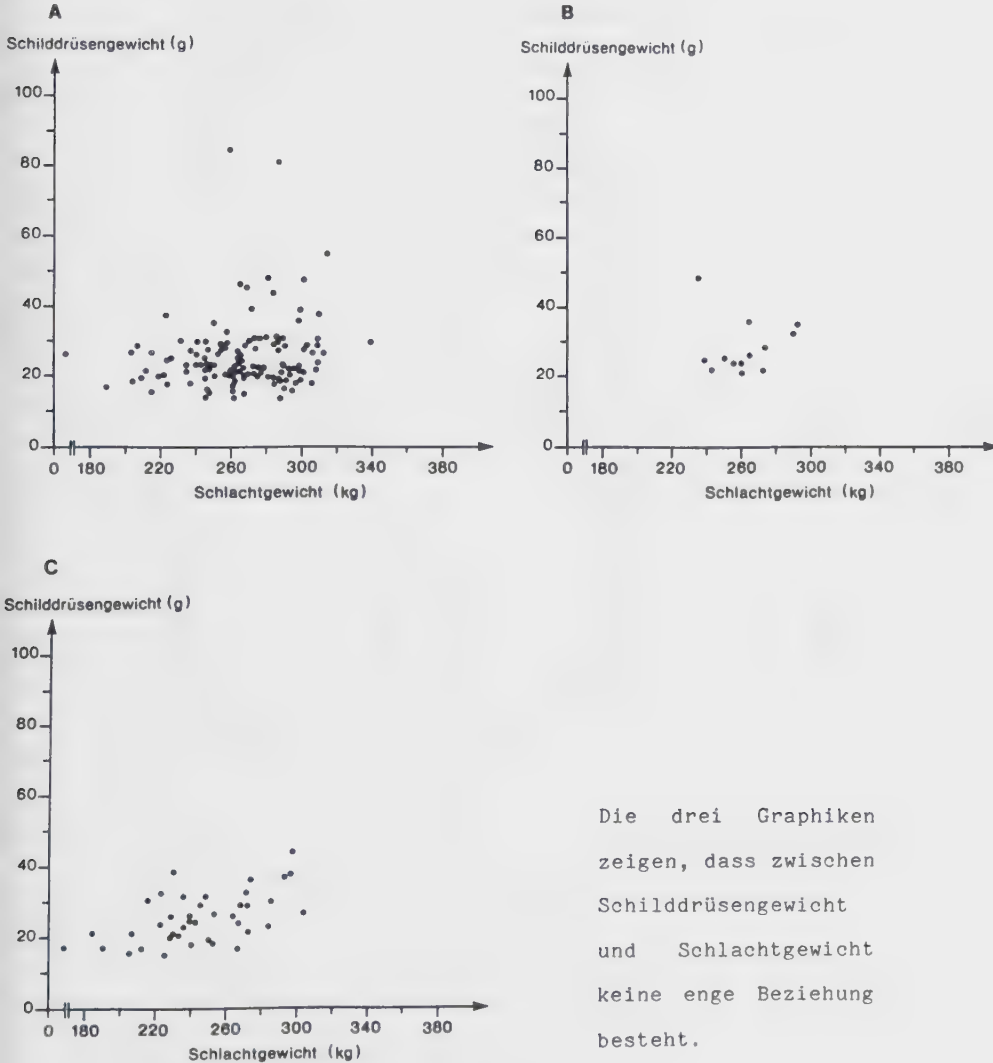
T₄-Werte beim Stier (A), Ochsen (B) und Rind (C) in Beziehung zum Gesamtgewicht der Schilddrüse



Aus den drei Graphiken geht deutlich hervor, dass zwischen T₄-Werten und Schilddrüsengewicht keine Beziehung besteht.

Abb. 6

Beziehung zwischen Gesamtgewicht der Schilddrüse und Schlachtgewicht beim Stier (A), Ochsen (B) und Rind (C)



Die drei Graphiken zeigen, dass zwischen Schilddrüsengewicht und Schlachtgewicht keine enge Beziehung besteht.

Abb. 7

Chromatogramm einer positiven (A) und einer negativen (B)

Serumprobe

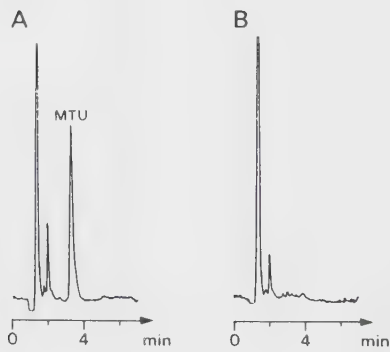


Abb. 8

**Chromatogramme von positiven und negativen Leber- und
Schilddrüsenproben**

- A. positive Leberprobe: 1,3 mg MTU/g
- B. negative Leberprobe
- C. positive Schilddrüsenprobe: 1,9 mg MTU/g
- D. negative Schilddrüsenprobe

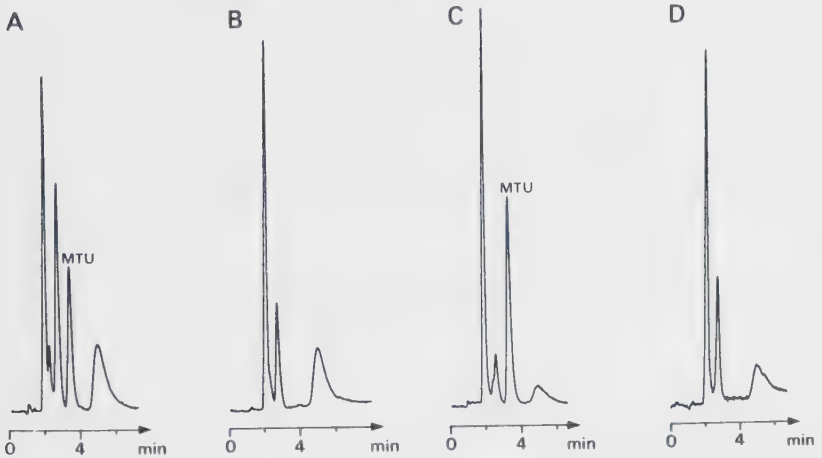
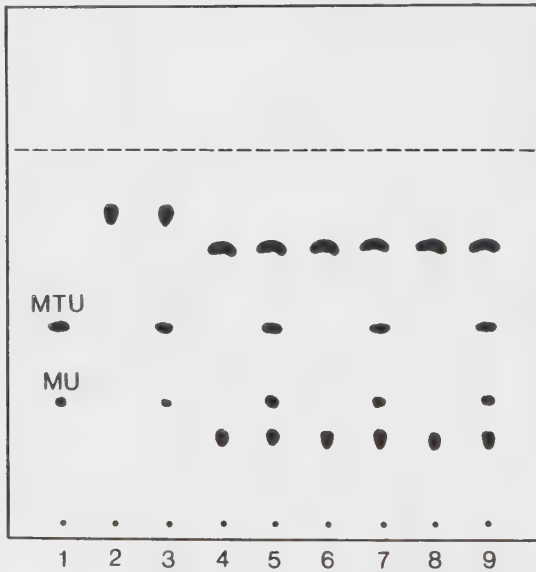


Abb. 9

Darstellung von Serum- und Gewebeextrakten nach Auftrennung mittels HPTLC*)

(*) aufgrund einer Photographie angefertigte Skizze)



- 1) Eichlösung: 5 mg MU/MTU/1
- 2) neg. Serumprobe
- 3) pos. Serumprobe
- 4) neg. Muskelprobe
- 5) pos. Muskelprobe
- 6) neg. Leberprobe
- 7) pos. Leberprobe
- 8) neg. Schilddrüsenprobe
- 9) pos. Schilddrüsenprobe

Tab. 1

Reproduzierbarkeit der TDx-Methode

Proben-Nr.	T ₄ (nmol/l)		VK %
	$\bar{x}$	s	
1	78,52	3,27	4,2
2	171,09	4,08	2,4

Zwei Serumproben mit einem hohen und einem tiefen T₄-Wert wurden je 10 mal gemessen.

Tab. 2

Einfluss des Einfrierens der Proben auf die T₄-Werte

10 Serumproben wurden frisch und nach 3 bzw. 16 Wochen Lagerung bei -28°C gemessen

Proben-Nr.	frisch T ₄ -Konz. (nmol/l)	nach 3 Wo T ₄ -Konz. (nmol/l)	nach 16 Wo T ₄ -Konz. (nmol/l)
1	57	57	64
2	40	42	41
3	79,5	76,5	92
4	70,5	63,5	74
5	58	52	52,5
6	51	54	53
7	55	55	60
8	82,5	81	91
9	63,5	58,5	59
10	58,5	59,5	69,5
	$\bar{x} = 61,5 \text{ nmol/l}$ $s = 12,94$	$\bar{x} = 59,9 \text{ nmol/l}$ $s = 11,48$	$\bar{x} = 65,6 \text{ nmol/l}$ $s = 16,4$

$p > 0,05$; nach t-Test gepaarter Stichproben

Tab. 3

Reproduzierbarkeit der verschiedenen Methoden zum Nachweis von MTU in Serum, Gewebe und Tausaft mittels HPLC

Methode I: Nachweis von MTU im Serum

Methode II: Nachweis von MTU in Gewebe und Tausaft

a) Lebergewebe

b) Lebertausaft

Methode	n	mg MTU/l bzw. g $\bar{x} \pm s$	VK %
I	5	11,9 $\pm$ 0,95	8,0
	5	10,8 $\pm$ 0,89	8,2
	5	14,7 $\pm$ 0,46	3,1
	5	10,1 $\pm$ 1,41	14,0
II _a	5	0,77 $\pm$ 0,14	18,4
	5	4,3 $\pm$ 0,31	7,2
	5	8,3 $\pm$ 0,85	10,3
II _b	5	0,50 $\pm$ 0,07	14,9
	4	6,5 $\pm$ 1,19	18,2

Tab. 4

Wiederfindungsrate im Serum und Gewebe

Methode I: Nachweis von MTU im Serum

Methode II: Nachweis von MTU im Gewebe

a) Leber

b) Schilddrüse

Methode	n	Zugefügte MTU-Konz. µg/ml bzw. g	Gemessene MTU-Konz. µg/ml bzw. g $\bar{x} \pm s$	Wiederfindungs- rate % $\bar{x} \pm s$	VK %
I	5	0,6	0,45 $\pm$ 0,03	77,5 $\pm$ 5,03	6,5
	5	1,2	1,1 $\pm$ 0,004	90,7 $\pm$ 0,4	0,4
	5	2,3	2,4 $\pm$ 0,25	103,5 $\pm$ 10,95	10,6
	5	5,6	6,4 $\pm$ 0,27	115,2 $\pm$ 4,83	4,2
IIa	3	1	0,33 $\pm$ 0,03	33 $\pm$ 2,7	8,4
	4	5	2,2 $\pm$ 0,16	44 $\pm$ 3,16	7,2
IIb	5	1	0,44 $\pm$ 0,03	44 $\pm$ 3,25	7,4
	5	5	3,2 $\pm$ 0,12	64 $\pm$ 2,43	3,8

Tab. 5

Einfluss von Transportstress und Schlachtvorgang auf die T_4 -Konzentration

	vor dem Transport		nach dem Transport		am betäubten hängenden Tier		beim Ausbluten	
	T_4 -Konz. nmol/l $\bar{x} \pm s$	Protein- konz. g/l $\bar{x} \pm s$	T_4 -Konz. nmol/l $\bar{x} \pm s$	Protein- konz. g/l $\bar{x} \pm s$	T_4 -Konz. nmol/l $\bar{x} \pm s$	Protein- konz. g/l $\bar{x} \pm s$	T_4 -Konz. nmol/l $\bar{x} \pm s$	Protein- konz. g/l $\bar{x} \pm s$
Gruppe I n = 9	100,2 $\pm$ 13,2	75,9 $\pm$ 10,1	111,7 $\pm$ 18,0	87,2 $\pm$ 9,46	111,7 $\pm$ 16,9	78,6 $\pm$ 10,3	112,9 $\pm$ 12,2	66,6 $\pm$ 7,38
Gruppe II n = 11	95,5 $\pm$ 18,2	70,2 $\pm$ 2,73	106,6 $\pm$ 19,4	69,8 $\pm$ 7,3	99,2 $\pm$ 37,2	68,9 $\pm$ 5,63	101,2 $\pm$ 18,0	67,0 $\pm$ 6,3
Gruppe III n = 9	98,3 $\pm$ 23,3	72,2 $\pm$ 3,2	107,9 $\pm$ 22,6	65,2 $\pm$ 4,1	108,9 $\pm$ 22,8	69,2 $\pm$ 4,9	105,5 $\pm$ 22,4	70,2 $\pm$ 5,48

Die T_4 -Werte bleiben nach dem Transport praktisch konstant; vor dem Transport sind sie bei allen Gruppen tiefer, bei Gruppe II und III sind die Unterschiede statistisch signifikant ($p < 0,05$), bei Gruppe I dagegen nicht ($p > 0,05$). Die Schwankungen in der Proteinkonzentration stehen dabei in keiner Relation zu den T_4 -Werten.

Tab. 6

Einfluss der Hämolyse auf die T₄-Konzentration

Anzahl Tiere: 8 Maststiere

Analysen Nr.	hämolytisches Blut T ₄ (nmol/l)	nicht hämolyt. Blut T ₄ (nmol/l)	Diff.(d) T ₄ (nmol/l)
1	40	77	37
2	14	93	79
3	50	138	88
4	78	150	72
5	44	114	70
6	28	92	64
7	67	125	58
8	43	77	34
	$\bar{x} = 45 \text{ nmol/l}$ $s = 20,23$	$\bar{x} = 108,25 \text{ nmol/l}$ $s = 27,75$	$\bar{d} = 62,75$ $s_d = 19,09$

$p < 0,05$; nach t-Test gepaarter Stichproben.

Tab. 7

T₄-Konzentrationen in venösem (V.jugularis) und in arteriellem Blut (Schwanzarterie)

Anzahl Tiere: 7 Kühe

Analysen Nr.	arteriell T ₄ (nmol/l)	venös T ₄ (nmol/l)	Diff. (d) T ₄ (nmol/l)
1	42	47	5
2	51	57	6
3	49	46	3
4	50	52	2
5	42	46	4
6	58	57	1
7	42	44	2
	$\bar{x} = 47,7$ $s = 6,07$	$\bar{x} = 49,9$ $s = 5,46$	$\bar{d} = 2,14$ $s_d = 3,24$

$p > 0,05$; nach t-Test gepaarter Stichproben

Die Blutproben stammen von Kühen, darum die tiefen T₄-Werte

Tab. 8

Auswertung der Schilddrüsengewichte

Gruppe	$\bar{x}$	Minimum	Maximum
Stiere n = 201	27,5 g	13,8 g	84,8 g
Ochsen n = 22	28,6 g	13,9 g	48,9 g
Rinder n = 52	26,0 g	14,9 g	46,1 g
Total n = 275	27,3 g	13,8 g	84,8 g

Tab. 9

HPLC-Analysen: MTU-Konzentration (mg/kg Frischgewebe bzw. Tausaft) zu verschiedenen Zeiten nach Beendigung der MTU-Zufütterung

	Tag der Absetzung von MTU			3 Tage nach Absetzung von MTU			7 Tage nach Absetzung von MTU			14 Tage nach Absetzung von MTU		
	2991	2994	2999	2992	3004	3005	2990	2998	3013	2997	3006	3009
Tier-Nr.												
Schilddrüse	25,7	17,2	45,0	13,1	7,43	6,98	0,19	1,32	1,61	0,35	0,26	0,23
Leber: Gewebe	2,6	3,0	6,7	0,8	0,7	0,5	0,06	-	-	0,26	-	-
Tausaft	2,5	2,5	6,5	1,0	0,9	0,7	0,6	-	-	-	-	-
Muskulatur: Gewebe	2,79	2,21	3,68	0,17	0,21	0,032	-	x	-	x	-	-
Tausaft	5,1	3,65	6,0	0,16	0,11	0,05	-	-	-	-	-	-

-: nicht untersucht; x: unter der Nachweisgrenze

Tab. 10

HPTLC-Analysen: MTU-Konzentration (mg/kg Frischgewebe bzw. Tausaft) zu verschiedenen Zeiten nach Beendigung der MTU-Zufütterung

Tier-Nr.	Tag der Absetzung von MTU			3 Tage nach Absetzung von MTU			7 Tage nach Absetzung von MTU			14 Tage nach Absetzung von MTU		
	2991	2994	2999	2992	3004	3005	2990	2998	3013	2997	3006	3009
Schilddrüse	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+
Leber	+++	++	+++	++	++	++	x	-	-	x	-	-
Muskulatur:	++	++	+++	x	x	x	-	-	-	-	-	-

+++ : sehr viel MTU
 ++ : viel MTU
 + : wenig MTU
 x : unter der Nachweisgrenze
 - : nicht untersucht

5. LITERATURVERZEICHNIS

McAllister, R.A. and Howells, K.W. (1952):

The colorimetric determination of Methylthiouracil and Propylthiouracil in tablets using 2:6-Dichloroquinone-Chloroimide.

J. Pharm. Pharmacol. 4, 259-261.

Benes, J. und Heinzl, F. (1984):

Erste klinische Erfahrungen mit der Bestimmung des freien Thyroxinanteils durch Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay im Vergleich zu FT₄-RIA.

Jahresbericht der Schweiz. Gesellschaft für Radiologie und Nuklearmedizin, 165-168.

Blum, J.W. (1983):

Endokrinologie und Tierproduktion.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 125, 827-850.

Böhnel, H.Th. (1966):

Untersuchungen zum Rückstandsproblem nach Anwendung von Methylthiouracil in der Jungbullenmast.

Vet.-Med. Diss., München.

De Brabander, H.F. and Verbeke, R. (1975):

Detection of antithyroid residues in meat and some organs of slaughtered animals.

J. Chromatogr. 108, 141-151.

Braun, S.L. (1984):

Die Bestimmung von Gesamt-Thyroxin und Thyronin-Uptake mit dem Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay.

Aerztl. Lab. 30, 172-176.

Brüggemann, J. et al. (1952):

Beiträge zur Frage der Verwendung von Masthilfsmitteln.

2 Mitt. Landwirtschaftl. Jahrbuch für Bayern 29, 511-522.

Burris, M.J. et al. (1953):

Alteration of activity of thyroid gland of beef cattle with Testosterone.

Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 84, 181-183.

Comsa, E. et al. (1982):

Méthodes d'identification et de dosage de substances thyroéostatiques dans des aliments pour bovins.

Bull. Acad. Vét. de France 55 (3), 411-422.

Crameri, F.:

Prüfung immunhistologischer Techniken zum indirekten Nachweis der missbräuchlichen Anwendung von Thyreostatika in der Rindermast.

Vet.-Med. Diss. Zürich (in Vorbereitung)

Donaldson, J.A. (1977):

The action of anabolic steroids on nitrogen metabolism and the endocrine system in ruminants.

Ph.D. Thesis, University of Reading.

Drepper, K. und Zucker, H. (1963):

Rindermast mit Methylthiouracil (MTU).

Tierzüchter 15, 389-390.

Fravolini, A. and Begliomini, A. (1965):

Gas chromatographic determination of thiouracils in Feeds.

J. Ass. Off. Anal. Chem. 48, 908-911.

Frens, A.M. (1958):

Methylthiouracil ("Veveron") als Futterzusatz bei der Mästung von Abmelkkühen.

Z. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelkd. 13, 289-290.

Geist, H. (1963):

Untersuchungen über den Einfluss von Methylthiouracil und 17- α -Aethynil-19-nortestosteron-oenanthat auf den Schlachtwert von Jungbullen.

Vet.-Med. Diss, München.

Gissel, H.C. und Schaal, M. (1974):

Eine dünn-schicht-chromatographische Untersuchungsmethode zum Nachweis von Thiouracilderivaten in der Schilddrüse schlachtbarer Haustiere.

Arch. Lebensmittelhyg. 25, 8-13.

Griem, W. (1973):

Pathologisch-histologische Veränderungen von Schilddrüsen bei Rindern und Kaninchen nach Verfütterung von Methylthiouracil.

BMTW 86 (3), 50-56.

Grote, J.W. (1931):

A new color reaction for soluble organic sulfur compounds. J. Biol. Chem. 93, 25-30.

Heitzmann, R.H. (1978):

The use of hormones to regulate the utilisation of nutrients in farm animals: Current farm practices.

Proc. Nutr. Soc. 37 289-293.

Heitzmann, R.H. et al. (1980):

Effect of anabolic steroids on plasma thyroid hormones in steers and heifers.

Brit. Vet. J. 136, 168-174.

Jarc, H. et al. (1977):

Der quantitative Nachweis von Oestrogenen und Thyreostatika mittels Dünnschichtchromatographie und Hochleistungs-dünnschichtchromatographie in tierischen Substraten.

J. Chromatogr. 134, 351-358.

Karg, H. (1966):

Hormonelle Wirkstoffe in der Mast.

Z. Tierzüchtg. Züchtungsbiol. 82, 154-168.

Kim, C. (1983):

Simple and sensitive method for the determination of propylthiouracil in blood by high-performance liquid chromatography.

J. Chromatogr. 272, 376-379.

Kracht, J. und Spaethe, M. (1953):

Ueber Wechselbeziehungen zwischen Schilddrüse und Nebennierenrinde.

Virchows Arch. 324, 83-109.

Laitem, L. and Gaspar, P. (1977):

Gas chromatographic determination of methylthiouracil residues in meat and organs of slaughtered animals.

J. Chromatogr. 140, 266-269.

Makumyaviri, A.M. et al. (1985):

Le stress de transport et l'histo-physiologie des surrénales et thyroïdes des bovins au Shaba: Cas du transfert du bétail de Kundelungu à l'abattoir de Lubumbashi (Zaïre).

Rev. Med. Vet. 136, 69-72.

Matthiesen, Th. (1970):

Versuche mit Methylothiouracil zur Ermittlung der unschädlichen Dosis im langfristigen Tierversuch.

Vet.-Med. Diss., Hannover.

Pochard, M.F. (1983):

Contrôle des résidus de thyroéostatiques dans la thyroïde et le muscle de bovin.

Bull. Acad. Vét. de France 56, 73-82.

Pochard, M.F. et al. (1983):

Détection du méthylthiouracile par chromatographie en couche mince haute performance dans la thyroïde et le muscle du bovin.

Analisis 11, 499-502.

Pochard, M.F. et al. (1984):

Dosage du méthylthiouracile dans du plasma de bovin par chromatographie liquide haute performance sur phase inverse.

J. Chromatogr. 298, 183-188.

Pohlschmidt, J. und Forschner, E. (1979a):

Untersuchung des Thyroxinspiegels von Mastbullen unter Methylthiouracil-Einfluss mit Hilfe eines Radioimmunoassays.

Fleischwirtsch. 59, 253-255.

Pohlschmidt, J. und Forschner, E. (1979b):

Dünnschichtchromatographischer Nachweis von Methylthiouracil (MTU) in Blutserum und Muskelsaft von Mastrindern.

Fleischwirtsch. 59, 557-560.

Postma, K.P. and Overhans. H.B.M. (1980):

Body-building.

Tijdschr. Diergeneesk. 105, 74-75.

Pottie, G. (1979):

Verwendbarkeit der histologischen Schilddrüsenuntersuchung bei erwachsenen Rindern zur Ermittlung des Missbrauches von Thyreostatika.

Fleischwirtsch. 59, 248-250.

Ratliff, C.R. et al. (1972):

Serum propylthiouracil: Determination by a direct colorimetric procedure.

Clin. Chem. 18, 1373-1375.

Rickenbacher, H. (1986):

Bestimmung von T₃ und T₄ bei Schlachtrindern mittels eines ELISA-Verfahrens im Hinblick auf eine missbräuchliche Verwendung von Thyreostatika.

Vet.-Med. Diss., Zürich

Selye, H. (1953):

Einführung in die Lehre vom Adaptationssyndrom.

G. Thieme Verlag, Stuttgart.

Seren, E. et Mora, A. (1973):

Funzionalità tiroidea di bovini normali et trattati con metiltiouracile.

Fol. Vet. Lat. 3, 52-73.

Sernetz, M. et al. (1966):

Nachweis von Methylthiouracil.

Zbl. Vet. Med. 13, 53-58.

Terplan, G. et al. (1964):

Zur Verwendung des Thyreostatikums Methylthiouracil in der Rindermast.

Fleischwirtsch. 5, 457-462.

Van Genderen, H. et al. (1948):

The determination of 4-methyl-2-thiouracil in animal tissue and blood.

Biochim. Biophys. 2, 482-485.

Van Waes, H. (1973):

Dosage du méthylthiouracil (MTU) dans la viande.

Rev. Agric. 26, 435-439.

Vos, J.G. et al. (1982):

Weight increase of the thyroid glands as tentative screening parameter to detect the illegal use of thyreostatic compounds in slaughter cattle.

Veterinary Quarterly, 4, 1-4.

Wöhlbier, W. und Schneider, W. (1966):

Der Stoffansatz bei Ochsen unter dem Einfluss von Methylthiouracil.

Z. Tierphysiol. 21, 34-40.

Wöhlbier, W. und Friede, H.J. (1966):

Ueber die Verfütterung von Thyreostatika an landwirtschaftliche Nutztiere.

Mitteilungen für Tierhaltung H 101, 14-20.

Wildanger, W. (1975a):

Trennung einiger Thyreostatika durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.

Chromatographie, 8, 42-44.

Wildanger, W. (1975b):

Der sup-ppm Nachweis thyreostatisch wirksamer Thiouracile im Fleisch mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie.

Z. Lebensmittel-Unt.-Forsch. 158, 1-3.

6. VERDANKUNGEN

Folgenden Personen möchte ich meinen Dank aussprechen:

- Herrn Prof. Dr. P.F. Suter für die Durchsicht des Manuskriptes und für die Uebernahme des Referates.
- Herrn PD Dr. H. Lutz für die Ueberlassung des Themas und für seine Unterstützung beim Ausführen der vorliegenden Arbeit.
- Herrn Dr. F. Untermann für die Uebernahme des Korreferates.
- Herrn J. Blum, Chemiker HTL des Vet.-Med. Labors, für seine Beratungen und Mithilfe bei der Durchführung der MTU-Analysen.
- Fräulein E. Liedl, chem. Laborantin des Vet.-Med. Labors, für die Durchführung der T₄-Analysen.
- Herrn F. Cramer, Institut für Veterinärpathologie, für die Bereitstellung der positiven Proben (Serum und Gewebe) aus seinem Kälberversuch.
- Herrn PD Dr. E. Eggenberger, Vet.-Med. Fakultät, für seine Arbeit und seine Beratungen betreffend der statistischen Auswertung.

- Frau E. Chakravorty, Bibliothekarin der Vet.-Med. Fakultät, für die Bereitstellung der notwendigen Literatur.
- Frau S. Pletscher, grafische Zeichnerin der Vet.-Med. Fakultät, für die Erstellung der Grafiken.
- Frau A. Hug, Photographin der Vet.-Med. Fakultät, für die Ausführung der photographischen Arbeiten.
- Fräulein G. Schmid für die sorgfältige Erstellung des Manuskriptes.

Lebenslauf

Name	Venzin Imelda
Heimatort	Curaglia / GR
Geboren	7.1.1959
Ausbildung	1966 - 1972 Primarschule in Curaglia
	1972 - 1979 Gymnasium in Disentis
	1979 Eidg. Matura Typ B
	1979 - 1984 Studium der Veterinärmedizin an den Universitäten Fribourg und Zürich
	1984 Herbst, Staatsexamen

